

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/31, 15/62</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/06567 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Februar 1999 (11.02.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/HP98/04723 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juli 1998 (27.07.98) (30) Prioritätsdaten: 197 32 829.6 30. Juli 1997 (30.07.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: LUBITZ, Werner [AT/AT]; Schönborngrasse 127, A-1080 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): RESCH, Stephanie [AT/DE]; Jawlenskystrasse 12, D-81477 München (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, OM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: SECRETION OF CARRIER-BONDED PROTEINS INTO THE PERIPLASMA AND THE EXTRACELLULAR SPACE (54) Bezeichnung: SEKRETION VON TRAGERGEBUNDENEN PROTEINEN IN DAS PERIPLASMA UND IN DEN EXTRAZELLULÄREN RAUM (57) Abstract The present invention relates to a method for producing s-layer proteins and modified s-layer proteins in gram-negative host cells. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SB	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
BE	Beland						

Sekretion von trägergebundenen Proteinen in das Periplasma und in den extrazellulären Raum

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von trägergebundenen Proteinen, insbesondere von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen in pro- oder eukaryontischen Wirtszellen.

10

Kristalline bakterielle Zelloberflächenlayer (S-Layer) bilden in vielen Eubakterien und den allermeisten Archaeobakterien die äußerste Zellwandkomponente (Sleytr et al. (1988), Crystalline Bacterial Cell Surface Layers, Springer Verlag Berlin; Messner und Sleytr, Adv.Mikrob.Physiol.33 (1992), 213-275). Die meisten der gegenwärtig bekannten S-Layer-Proteine sind aus identischen Proteinen bzw. Glykoproteinen zusammengesetzt, die scheinbare Molekulargewichte im Bereich von 40 000 bis 220 000 aufweisen. Die Komponenten von S-Layern sind selbst-assemblierend und die meisten Gitter haben eine schräge (p2), quadretische (p4) oder hexagonale (p6) Symmetrie. Die Funktionen von bakteriellen S-Layern sind immer noch nicht vollständig bekannt, aber aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche dürften die porösen kristallinen S-Layer hauptsächlich als Schutzhüllen, Molekularsiebe oder zur Förderung der Zelladhäsion und Oberflächen-

20

erkennung dienen.

25

Genetische Daten und Sequenzinformationen sind für verschiedene S-Layer-Gene aus Mikroorganismen bekannt. Eine Übersicht findet sich bei Peyret et al., Mol.Microbiol.9 (1993), 97-109. Auf diese Daten wird ausdrücklich Bezug genommen. Die Sequenz des für das S-Layer-Protein von *B.stearothermophilus* PV72 kodierenden Gens sbsA und ein Verfahren zu dessen Klonierung sind bei Kuen et al. (Gen 145 (1994), 115-120) angegeben.

30

- 2 -

B.stearotherophilus PV72 ist ein gram-positives Bakterium, das mit einem hexagonal angeordneten S-Layer bedeckt ist. Die Hauptkomponente des S-Layer ist ein 128 kd-Protein, bei dem es sich um das häufigste Protein in der Zelle mit einem Anteil von ungefähr 15% bezüglich der gesamten Proteinbestandteile handelt. Es sind verschiedene Stämme von B.stearotherophilus charakterisiert worden, die hinsichtlich des Typs von S-Layer-Gitter, dem Molekulargewicht und der Glykosilierung der S-Layer-Komponenten unterschiedlich sind (Messner und Sleytr (1992), supra).

Die deutsche Patentanmeldung DE-OS 44 25 527 offenbart den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt des S-Layer-Gens aus B.stearotherophilus und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure kann operativ mit einer Protein-kodierenden Nukleinsäure verknüpft werden und zur rekombinanten Herstellung von Proteinen in einem Verfahren verwendet werden, bei dem man eine transformierte Wirtszelle bereitstellt, die Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung und Sekretion des davon kodierten Polypeptids führen, und das resultierende Polypeptid aus dem Kulturmedium gewinnt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise prokaryontische Organismen, insbesondere gram-positive Organismen der Gattung Bacillus genannt.

In der internationalen Patentanmeldung PCT/EP97/00432 wird die rekombinante Herstellung von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen im Cytoplasma gram-negativer Wirtszellen vorgeschlagen.

Überraschenderweise wurde nun festgestellt, daß die rekombinante Herstellung von S-Layer-Proteinen nicht nur im Cytoplasma gram-negativer prokaryontischer Wirtszellen möglich ist, sondern daß auch eine rekombinante Expression durchgeführt werden kann, die eine Integration in der äußeren oder der cytoplasmatischen Membran, in Sekretion in das

- 3 -

Periplasma oder/und eine Sekretion in den extrazellulären Raum umfaßt. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß eine rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen auch in eukaryontischen Wirtszellen gelingt.

- 5 Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung von S-Layer Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer Signalsequenz, die für
10 ein Peptid kodiert, das eine Integration des S-Layer-Proteins in der äußeren Membran der Wirtszelle, eine Integration des S-Layer-Proteins in der cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle, eine Sekretion des S-Layer-Proteins in den periplasmatischen Raum der Wirtszelle oder/und eine Sekretion in das die Wirtszelle umgebende
15 Medium bewirkt,
 - (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und
 - (c) gegebenenfalls das resultierende Polypeptid aus der äußeren
20 Membran der Wirtszelle, cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle, aus dem periplasmatischen Raum der Wirtszelle oder/und aus dem die Wirtszelle umgebenden Medium gewinnt.

- Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur
25 Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (e) eine eukaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure vorzugsweise in operativer Verknüpfung mit einer Signalsequenz, die eine Integra-
tion des S-Layer-Proteins in der cytoplasmatischen Membran der
30 Wirtszelle, eine Integration des S-Layer-Proteins in ein Organell der Wirtszelle oder/und einer Sekretion in das die Wirtszelle umgebende Medium bewirkt,

- 4 -

- (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und
- (c) gegebenenfalls das resultierende Polypeptid aus der cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle, einer Organelle der Wirtszelle oder/und aus dem die Wirtszelle umgebenden Medium gewinnt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß eine Sekretion beliebiger heterologer S-Layer-Proteine, auch rekombinanter S-Layer-Proteine in den periplasmatischen Raum einer gram-negativen Wirtszelle oder sogar eine Sekretion in das die Wirtszelle umgebende Medium möglich ist. Dabei bildet sich das S-Layer-Protein im Periplasma der Wirtszelle nicht in Form von ungeordneten Einschlußkörpern, sondern unerwarteterweise in Form von geordneten monomolekularen Schichten. Außerdem ist eine Verankerung von heterologen S-Layer-Proteinen in der äußeren oder der cytoplasmatischen Membran von gram-negativen Wirtszellen möglich.

Auch in eukaryontischen Zellen wie etwa Säugerzellen oder Hefe können S-Layer-Proteine in funktionaler Form exprimiert werden. Bei rekombinanten S-Layer-Proteinen, die einen eukaryontischen Fusionsanteil tragen, findet eine Glykosilierung statt. Außerdem kann im S-Layer-Proteinanteil selbst eine Glykosilierung stattfinden.

Vorzugsweise ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Expression von S-Layer-Genen, die aus *B. stearothermophilus* PV72 stammen, insbesondere die Expression der S-Layer Gene *sbsA* und *sbsB*. Daneben können aber auch S-Layer-Gene aus anderen Organismen (vgl. z.B. Peyret et al., (1993) supra) durch das erfindungsgemäße Verfahren exprimiert werden.

Die Nukleotidsequenz des für das reife SbsA-Protein kodierenden Gens ist in SEQ ID No. 1 von Position 91-3684 angegeben. Die zugehörig

- 5 -

Aminosäuresequenz ist in SEQ ID No. 2 dargestellt. Die Nukleotidsequenz des für das reife SbsB-Protein kodierenden Gens ist in SEQ ID No. 5 von Position 94-2763 angegeben. Die zugehörige Aminosäuresequenz ist in SEQ ID No. 6 dargestellt.

5

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform (sbsA) wird die Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert, ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 91 bis 3684 in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleotidsequenz umfaßt,
- 10 (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

15

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform (sbsB) wird die Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert, ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 94 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz umfaßt,
- 20 (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz umfaßt und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

25

Unter dem Begriff "stringente Hybridisierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach Waschen bei
30 55°C, vorzugsweise 60°C, in einem wäßrigen Niedrigselz-Puffer (z.B. 0,2 x SSC) noch auftritt (s. auch Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual).

- 6 -

- Gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung werden gram-negative prokaryontische Wirtszellen verwendet. Dabei wird überraschenderweise im Periplasma eine geordnete assemblierte S-Layer-Proteinstruktur erhalten. Vorzugsweise werden als Wirtszellen Enterobakterien, insbesondere E.coli, verwendet. Beispiele für geeignete E.coli Stämme sind DH5 α (sup E44, Δ lac U169, hsdR17, recA1, endA1, gyr A96, thi-1, rel A1; Henahan, J. Mol. Biol. 166 (1983), 557-580) und HB 2151 (K12, ara, Δ (lac-pro), thi/F', pro A + B+, lacIqZAM15; Pharmacia Biotech).
- 10 Gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung werden eukaryontische Wirtszellen verwendet. Vorzugsweise verwendet man Hefezellen, Säugerkzellen wie etwa CHO Zellen oder humane Zellen, Insektenzellen oder Pflanzenzellen.
- 15 Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Gewinnung rekombinanter S-Layer-Proteine eingesetzt werden. Hierzu verwendet man eine für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure, die eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren. Diese Insertionen können einerseits nur für Peptide mit wenigen Aminosäuren, z.B. 1-25
- 20 Aminosäuren, kodieren. Andererseits können die Insertionen auch für größere Polypeptide von z.B. bis zu 1000 Aminosäuren und vorzugsweise bis zu 500 Aminosäuren kodieren, ohne daß die Fähigkeit des S-Layer-Proteins zur Ausbildung einer korrekt gefalteten Struktur verlorenggeht. Neben den Insertionen kann das rekombinante S-Layer-Protein auch
- 25 Aminosäuresubstitutionen, insbesondere Substitutionen einzelner Aminosäuren im Bereich der Insertionsorte sowie gegebenenfalls Deletionen einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von bis zu 30 Aminosäuren aufweisen.
- 30 Als Insertionsstellen für Peptid- oder Polypeptid-kodierend Sequenz n in das sbsA-Gen bevorzugt sind Bereiche zwischen den Positionen 200-3600 oder in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz. Besonders bevorzugte

- 7 -

Insertionsstellen sind die NruI-Schnittstelle an Position 585, die PvuII-Schnittstelle an Position 881, die SnaB-I-Schnittstelle an Position 920, die PvuII-Schnittstelle an Position 2507 und die PvuII-Schnittstelle an Position 2652 (PCT/EP 97/00 432). Weitere bevorzugte Insertionsstellen sind die Positionen 562, 1087, 1813, 1947, 2295, 2652, 3046, 3484 und 3594. Die jeweils angegebenen Positionen beziehen sich auf das erste Nukleotid der Insertion.

Als Insertionsstellen in das sbsB-Gen bevorzugt sind Bereiche zwischen den Positionen 200-2600 der in SEQ ID No. 5 gezeigten Nukleotidsequenz. Besonders bevorzugte Insertionsstellen sind die Positionen 410 (Codon 136), 484 (Codon 161/162) und 1583 (Codon 528/529) (PCT/EP 97/00432). Weitere bevorzugte Insertionsstellen sind die Positionen 598, 1012, 1435, 1808 und 2301, wobei sich die jeweils angegebene Position auf das erste Nukleotid der Insertion bezieht.

Die Peptid- oder Polypeptid-kodierenden Insertionen werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geordneten Aminosäuren, z.B. Arg. Lys, Asp oder Glu, oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, antigene, allergene oder immunogene Epitope, metallbindende Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel für eine Insertion in die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ist eine für Streptavidin kodierende Nukleotidsequenz. Auf diese Weise können universelle Trägermoleküle erhalten werden, die zur Ankopplung von biotinylierten Reagenzien an das integrierte Streptavidin des rekombinanten S-Layerproteins und zum Nachweis in immunologischen oder Hybridisierungstestverfahren geeignet sind.

- 8 -

Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für Insertionen sind antigene, allergene oder immunogene Epitope, z.B. Epitope aus pathogenen Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Pilzen, Parasiten etc. und Viren, oder Epitope aus Pflanzen oder Epitope gegen körpereigene Substanzen, z.B. Cytokine, sowie gegen Toxine, insbesondere Endotoxine. Besonders bevorzugte Beispiele für immunogene Epitope sind Epitope aus Viren, z.B. aus Herpesviren, wie etwa Herpesvirus 1, z.B. Glykoprotein Δ , Herpesvirus 6 oder Pseudorabiesvirus (Lomniczi et al., J. Virol. 49 (1984), 970-979), insbesondere Epitope aus den Genen gB, gC oder/und gD, Epitope aus Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV), insbesondere Epitope aus den Genabschnitten, die für VP1, VP2 oder/und VP3 kodieren, Epitope aus Flaviviren oder Epitope aus Filoviren wie etwa Ebola-, Marburg- oder Lassavirus. Die immunogenen Epitope können so ausgewählt werden, daß sie die Erzeugung einer Antikörpervermittelten Immunreaktion fördern oder/und die Erzeugung einer zellulären Immunreaktion, z.B. durch Stimulation von T-Zellen, fördern. Beispiele für geeignete allergene Epitope sind Birkenpollenallergene, z.B. Bet v I (Ebner et al., J. Immunol. 150 (1993) 1047-1054). Weiterhin besonders bevorzugt sind antigene Epitope, die in der Lage sind, aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten körpereigene oder körperfremde Substanzen wie etwa Cytokine oder Toxine zu binden und herauszufiltrieren. Derartige Epitope können Bestandteile von Cytokin- oder Toxinrezeptoren oder von Antikörpern gegen Cytokine oder Toxine umfassen.

Modifizierte S-Layer-Proteine, die immunogene oder/und antigene Epitope mit Glykosilierungsstellen aufweisen, werden vorzugsweise in eukaryontischen Wirtszellen hergestellt, in denen eine Glykosilierung möglich ist. Dabei können auch die natürlichen S-Layer-Sequenzen glykosiliert werden. Beispiele für potentielle N-Glykosilierungsstellen im S-Layer-Gen sbsA sind die Aminosäurepositionen 26, 285, 343, 384, 387, 388, 418, 421, 483, 653, 675, 902, 924, 1048, 1058, 1118, 1154 und 1161. Im sbsB-Gen kann eine potentiell N-Glykosilierung an den Positionen 155, 184, 213, 302, 303, 400, 463, 606, 755 und 915 stattfinden. Weitere mögliche

- 9 -

Modifikationen des sbsA-Gens umfassen Amidierung, Phosphorylierung durch Caseinkinase II, N-Myristoylierung und Phosphorylierung durch Proteinkinase C. Weitere mögliche Modifikationen des sbsB Gens umfassen Phosphorylierung durch cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase, Phosphorylierung durch Caseinkinase II, N-Myristoylierung, Phosphorylierung durch Proteinkinase C und Anlagerung an einen Fibronectin Rezeptor (über Sequenz RGD).

Andererseits können die Insertionen auch für Enzyme kodieren. Bevorzugte Beispiele sind Enzyme zur Synthese von Polyhydroxybuttersäure, z.B. PHB-Synthase. Durch Einbau von PHB-Synthase in den S-Layer kann bei Zufuhr des Substrats Hydroxybuttersäure unter geeigneten Bedingungen eine molekulare Spinndüse entstehen. Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für ein Enzym ist bakterielle Luciferase. Hier kann bei Zufuhr des Enzymsubstrates, eines Aldehyds, sowie FMNH₂ (reduziertes Flavinmononukleotid), und in Anwesenheit von O₂ ein molekularer Laser erhalten werden.

Ebenfalls bevorzugt sind Insertionen, die für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren kodieren. Diese Moleküle können beispielsweise in Kombination mit immunogenen Epitopen zur Herstellung von Vakzinen verwendet werden.

Schließlich sind auch Insertionen bevorzugt, die für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein-A oder Protein-G oder für DNA- oder/und metallbindende Epitope, wie etwa Leucin-Zipper, Zinkfinger etc. kodieren.

So wird durch die vorliegende Erfindung erstmals eine gram-negative prokaryontische Zelle bereitgestellt, die in der äußeren Membran, in der cytoplasmatischen Membran, vorzugsweise an deren Innenseite oder/und im Periplasma immobilisierte rekombinante Polypeptide in nativer Form, z. B. aktive Enzyme enthält. Pro mm² rekombinanten S-Layer können auf diese Weise 50.000 - 200.000, z.B. ca. 100.000 rekombinante Moleküle

- 10 -

immobilisiert werden. Pro kg rekombinante E.coli Zellen können bis zu 3.000 m² S-Layer erhalten werden.

Weiterhin wird durch die vorliegende Erfindung erstmals eine eukaryontische
5 Zelle bereitgestellt, die in der cytoplasmatischen Membran, vorzugsweise an deren Innenseite oder/und in Zellorganellen wie etwa Golgi, Lysosomen, Mitochondrien, Chloroplasten, Vacuolen oder endoplasmatisches Reticulum immobilisierte rekombinante S-Layer-Polypeptide enthält.

10 Darüber hinaus sind insbesondere für die Sekretion ins Periplasma rekombinante S-Layerproteine bevorzugt, in die Cysteinreste eingebaut wurden. Durch Auswahl der Insertionspositionen kann ein kovalentes Crosslinking der S-Layer im Periplasma erreicht werden oder/und bei Insertion an nicht zum Crosslinking geeignete Positionen können Andockstellen für Polypepti-
15 de, z.B. für Enzyme, bereitgestellt werden, die über eine freie SH-Gruppe kovalent mit dem S-Layer verknüpft werden können. Besonders bevorzugt eignen sich hierzu rekombinante Polypeptide, in die durch gentechnische Methoden ein zusätzlicher Cysteinrest, vorzugsweise am N- oder am C-Terminus oder an einer oberflächenlokalisierten Domäne eingeführt wurde
20 und die durch Auswahl eines geeigneten Expressionssystems ebenfalls ins Periplasma der rekombinanten Wirtszelle sekretiert werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer für ein
25 Signalpeptid von gram-negativer Bakterien oder von eukaryontischen Zellen kodierenden Nukleinsäure verwendet, d.h. 5'-seitig von der S-Layer-Protein-kodierenden Nukleinsäure ist die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure angeordnet.

30 Bei einer Integration in die äußere Membran prokaryontischer gram-negativer Wirtszellen kann als Signalpeptid-kodierende Sequenz die C-terminale

- 11 -

Domäne der IgA-Protease aus *Neisseria* oder *Haemophilus* (Klauser et al., J. Mol. Bio. 234 (1993), 579-593) verwendet werden.

Bei einer Integration in die cytoplasmatische Membran gram-negativer prokaryontischer Wirtszellen wird vorzugsweise ein hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne, die eine α -helikale Struktur besitzt, verwendet. Beispiele von DNA-Sequenzen, die für eine solche membranintegrierende Proteindomäne kodieren, sind im europäischen Patent 0 516 655 beschrieben.

Bei einer Sekretion ins Periplasma gram-negativer prokaryontischer Zellen kann die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID No. 7 bzw. Fig. 4 dargestellten Nukleotidsequenz, (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% homologe Nukleotidsequenz umfassen. Andere Sequenzen, die eine Sekretion ins Periplasma bewirken, sind beispielsweise bei Blondel und Sedouelle (Eur. J. Biochem 193 (1990), 325-330; Adip-Conquy et al. (Protein Eng. 8 (1995), 859-863); Weller et al (Eur. J. Biochem. 236 (1996), 34-39) und Dubreuil et al. (FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13 (1996), 317-323) beschrieben.

Bei einer Sekretion ins extrazelluläre Medium gram-negativer prokaryontischer Zellen kann die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID No. 8 bzw. Fig. 5 dargestellten Nukleotidsequenz, (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% homologe Nukleotidsequenz umfassen. Darüber hinaus sind aber auch andere Signalpeptid-kodierende Sequenzen geeignet wie etwa von Yuan et al. (Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997),

- 12 -

263-269) und Hoogenboom et al. (Nucleic Acids Res. 19 (1991), 4133-4137) beschrieben.

Für die Expression in der cytoplasmatischen Membran oder in Organellen eukaryontischer Zellen sind als Signalpeptid-kodierende Nukleinsäuren das N-terminale Transitpeptid von Plastocyanin für den Transport in Chloroplasten (Weisbeek et al., J. Cell. Sci. Suppl. 11 (1989), 199-223), mitochondriale Signalpeptide für den Transport in Mitochondrien (Skerjanc, Biochem. Cell. Biol. 68 (1990), 9-16), Targetingsequenzen für den Transport in Vakuolen (Vitale und Chrispeels, Bioessays 14 (1992), 151-160), Targetingsequenzen für die Zellmembran, das Cytoplasma und den Golgiapparat (Stanley, Mol. Membr. Biol. 13 (1996), 19-27), Retentionssignale für das endoplasmatische Reticulum (Lencer et al., J. Cell. Biol. 131 (1995), 951-962) und Transfersequenzen für den Golgiapparat oder die Plasmamembran (Rambourg et al., Anat. Rec. 245 (1996), 447-458) bekannt.

Für die Sekretion ins extrazelluläre Medium eukaryontischer Zellen sind als Signalpeptid-kodierende Nukleinsäuren der hsp 150 Delta-Carrier (Jamsa et al., Yeast 11 (1995), 1381-1391), das Signalpeptid von Melittin aus der Honigbiene (Sisk et al., J. Virol 68 (1994), 766-775), Signalpeptide aus Baculovirus (Murphy et al., Protein Expr. Purif. 4 (1993), 349-357), Fragmente des K1 Killerpräprotoxins (Cartwright et al., Yeast 8 (1992), 261-272), das Signalpeptid und die N-terminale Proregion von Peptidylglycin α -hydroxylierender Monooxygenase (Mains et al., Mol. Endocrinol. 9 (1995), 3-13), das Maltose-Bindeprotein MalE mit dessen Signalsequenz (Staropoli et al., J. Virol. Methods 56 (1996), 179-189; Clement und Jehanna, J. Biotechnol. 43 (1995), 169-181), die Präpro- α -Faktor-Leaderregion des Hefe MF α 1 Gens (Elliot et al., Gene 79 (1989), 167-180), die Signalsequenz des IL-1 Rezeptorantagonisten (Wingren et al., Cell Immunol. 169 (1996), 226-237), das Signalpeptid des Weiz n- α -Amylasogens (Ribbe und Nagarajan, Mol. Genet. 235 (1992), 333-339), Sekretionspolypeptide aus Pilzen (Punt et al., Antonie Van Leeuwenhoek 65 (1994), 211-216), das

- 13 -

Leaderpeptid des Killertoxins aus *Kluyveromyces lactis* (Baldari et al., EMBO J. 6 (1987), 229-234) und die Inulinasesignalsequenz (Kang et al., J. Biotechnol. 48 (1996), 15-24) bekannt. Fusionskonstrukte aus MalE und SbsA sowie aus MalE und SbsB sind in der vorliegenden Anmeldung
5 beschrieben.

Neben dem für das Signalpeptid kodierenden Abschnitt kann die für das S-Layer-Protein kodierende DNA-Sequenz einen oder mehrere weitere Abschnitte enthalten, die für weitere Proteindomänen kodieren. Ein solcher
10 Abschnitt kann vorzugsweise zwischen dem für das Signalpeptid kodierenden Abschnitt und dem für das S-Layer-Protein kodierenden Abschnitt angeordnet sein. Vorzugsweise kodiert dieser Abschnitt für ein sekretorisches Polypeptid aus gram-negativen bakteriellen oder eukaryontischen Organismen oder einen Teil davon. Ein bevorzugtes Beispiel für einen
15 solchen Nukleinsäureabschnitt ist des malE Gen, welches das Maltose-Bindeprotein kodiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können auch mehrere S-Layer-Gene in einer einzigen Wirtszelle exprimiert
20 werden. Vorzugsweise werden zu diesem Zweck mindestens zwei S-Layer-Gene exprimiert, wobei eines davon für ein modifiziertes S-Layer-Protein und ein anderes für ein nicht modifiziertes S-Layer-Protein kodiert. Das nicht modifizierte S-Layer-Protein ist vorzugsweise in der Lage, eine mit dem modifizierten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein
25 Beispiel für diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine E.coli Zelle, welche mit zwei S-Layer-Genen transformiert ist, von denen eines ein natürliches sbsA- oder sbsB-Gen ist und das andere ein rekombinantes sbsA- oder sbsB-Gen ist.

30 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist in Nukleinsäure, die für ein gegebenfalls heterologe Peptid- oder Polypeptidin-

- 14 -

sertionen enthaltendes S-Layer-Protein kodiert und in operativer Verknüpfung mit einer Signalsequenz ist, die für ein Peptid kodiert, das

- (a) eine Integration in die äußere oder cytoplasmatische Membran einer gram-negativen prokaryontischen Wirtszelle, eine Sekretion in den periplasmatischen Raum einer gram-negativen prokaryontischen Wirtszelle oder/und eine Sekretion in das extrazelluläre Medium einer gram-negativen prokaryontischen Wirtszelle, oder
- (b) eine Integration in die cytoplasmatische Membran einer eukaryontischen Wirtszelle, eine Integration in eine Organelle einer eukaryontischen Wirtszelle oder/und eine Sekretion in das extrazelluläre Medium einer eukaryontischen Wirtszelle bewirkt.

Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure für ein rekombinantes S-Layer-Protein wie zuvor angegeben.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Der Vektor ist vorzugsweise in Prokaryonten oder/und in Eukaryonten replizierbar. Besonders bevorzugt ist der Vektor ein prokaryontisches oder ein eukaryontisches Plasmid. Weiterhin ist bevorzugt, daß der Vektor die erfindungsgemäße Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer in gram-negativen oder eukaryontischen Zellen aktiven Expressionskontrollsequenz ist. Besonders bevorzugt umfaßt die Expressionskontrollsequenz einen regulierbaren Promotor. Beispiele für geeignete prokaryontische Promotoren sind der tac-, lac-, trp- oder λ -Promotor. Beispiele für geeignete eukaryontische Promotoren sind der SV40-, CMV- oder Metallothionein-Promotor.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäure oder einem rekombinanten Vektor gemäß vorliegender Erfindung transformiert ist. Vorzugsweise ist die Zelle eine gram-negativ prokaryontische Zelle, z.B. eine E.coli-Zelle, oder in

- 15 -

eukaryontische Zelle, z.B. eine Hefezelle oder eine CHO-Zelle. Die erfindungsgemäße Zelle kann der cytoplasmatischen Membran, dem Periplasma oder einer Zellorganelle eine rekombinante S-Layerstruktur enthalten. Verfahren zur Transformation von Zellen mit Nukleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik (siehe Sambrook et al., supra) und brauchen daher nicht erläutert zu werden.

Aus rekombinanten S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur assembliert werden, die als Untereinheit mindestens ein erfindungsgemäßes rekombinantes S-Layer-Protein enthält. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur als "Verdünnungsmoleküle" auch nichtmodifizierte S-Layer-Proteine enthält. Die nichtmodifizierten S-Layer-Proteine liegen vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10-99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

Die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur kann mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfassen. Kovalente Verknüpfungen können beispielsweise durch Insertionen von Cysteinresten und einer anschließenden Ausbildung von Cystinbrücken eingeführt werden. Verknüpfungen durch Affinitätsbindung umfassen beispielsweise Antikörper-Antigen-, Antikörper-Protein A- bzw. -Protein G- oder Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen.

S-Layer-Strukturen, die rekombinante S-Layer-Proteine enthalten, können gegebenenfalls auch in trägergebundener Form hergestellt werden. Hierzu kann die Reassemblierung der S-Layer-Struktur aus einzelnen Einheiten in Gegenwart eines Peptidoglycanträgers erfolgen, wobei beispielsweise Peptidoglycanschichten erzeugt werden, die auf einer oder auf beiden Seiten mit einer S-Layer-Struktur überzogen sind. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung trägergebundener S-Layer-Strukturen besteht darin, eine S-Layer-Schicht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien, z.B. Wasser/Luft, zu erzeugen und diese Schicht auf einer Festphase, z.B. einer Filtermem-

- 16 -

bran, zu immobilisieren (vgl. z.B. Pum und Sjöström (1994), Thin Solid Films 244, 882-886; Küpcü et al. (1995), Biochim. Biophys. Acta 1235, 263-269).

5 Die rekombinanten S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen sind für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans, wobei man rekombinante S-Layer-Proteine verwendet, die immunogene Epitope von Pathogenen und/oder körpereigene immunstimulierende Polypeptide, wie etwa Cytokine,
10 enthalten. Bei dieser Anwendung ist nicht unbedingt eine Reinigung der rekombinanten S-Layer-Proteine erforderlich. Stattdessen kann beispielsweise die Verwendung in Kombination mit einem Bakterienghost erfolgen, der ggf. in seinem periplasmatischen Raum, seiner äußeren Membran oder seiner cytoplasmatischen Membran seiner Membran zusätzliche immuno-
15 gene Epitope enthält.

Die Herstellung geeigneter "Bakterienghosts" ist beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP91/00967 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Dort werden modifizierte Bakterien
20 offenbart, erhältlich durch Transformation eines gram-negativen Bakteriums mit dem Gen eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bakteriophagen, mit dem Gen eines lytisch wirkenden Toxin-Freisetzungspoteins oder mit Genen, die Teilsequenzen davon, die für lytische Proteine kodieren, enthalten, Kultivierung des Bakteriums, Expression dieses Lyse-Gens und
25 Isolierung des resultierenden Bakterienghosts aus dem Kulturmedium.

An die Membran dieser Bakterien kann, wie im europäischen Patent 0 516 655 beschrieben, ein rekombinantes Protein gebunden sein, das durch Expression einer rekombinanten DNA in diesen gram-negativen Bakterien
30 erhältlich ist. Diese rekombinante DNA umfaßt eine erste DNA-Sequenz, welche für eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne, die eine α -helikale Struktur besitzt und aus 14-20 Amino-

- 17 -

säuren besteht, die N- und C-terminal von je 2-30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein können, kodiert. Mit dieser ersten DNA-Sequenz in operativer Verknüpfung befindet sich eine zweite DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes rekombinantes Protein kodiert. Weiterhin enthält das gram-negative
5 Bakterium eine dritte DNA-Sequenz, die unter einer von den ersten und zweiten DNA-Sequenzen getrennten Kontrolle steht und für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-Freisetzungspolypeptid oder für deren lytisch wirkende Teile kodiert. Durch Expression und Lyse derartiger rekombinanter, gram-negativer
10 Bakterien werden sog. "Bakterienghosts" erhalten, die eine intakte Oberflächenstruktur mit an die Oberfläche gebundenen immunogenen Epitopen enthalten.

Bei Kombination dieser Bakterienghosts mit erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layern können Vakzine und Adjuvantien erzeugt werden, die
15 besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

Eine weitere besonders bevorzugte Verwendung für rekombinante S-Layer-Proteine und S-Layer Strukturen ist die Verwendung als Enzymreaktor. Ein
20 solcher Enzymreaktor kann beispielsweise von einer Zelle gebildet werden, die in ihrem Inneren eine erfindungsgemäße rekombinante S-Layer-Struktur enthält. Andererseits kann der Enzymreaktor auch aus isolierten und in vitro reassemblierten S-Layer-Strukturen oder Kombinationen verschiedener S-Layer-Strukturen gebildet werden.

25

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen:

- 30 SEQ ID NO.1 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsA von *B. stearothermophilus*;
SEQ ID NO.2 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;

- 18 -

- SEQ ID NO.3 die Nukleotidsequenz des Primers T5-X;
 SEQ ID NO.4 die Nukleotidsequenz des Primers E;
 SEQ ID NO.5 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden
 Abschnitts des S-Leyer-Gens sbsB von
 5 B.stearothermophilus;
 SEQ ID NO.6 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;
 SEQ ID NO.7 die Signalsequenz des malE Gens;
 SEQ ID NO.8 die Signalsequenz von Gen3 der Bakteriophagen fd;
 Fig.1 eine schematische Darstellung des zur Herstellung des
 10 rekombinanten Vektors pBK4 verwendeten sbsA PCR-Frag-
 ments;
 Fig.2 eine schematische Darstellung der Herstellung des das malE-
 sbsA-Fusionsgen enthaltenden Vektors pMAL-A (Beispiel 7),
 Fig.3 eine schematische Darstellung des Vektors pCant-A (Beispiel
 15 B),
 Fig.4 die Nukleotidsequenz eines sbsA-Gens fusioniert mit dem
 malE-Gen einschließlich dessen Signalsequenz,
 Fig.5 die Nukleotidsequenz eines sbsA-Gens fusioniert mit der
 Signalsequenz von Gen3 des Bakteriophage fd und
 20 Fig.6 die Nukleotidsequenz eines sbsB-Gens fusioniert mit dem
 malE-Gen einschließlich dessen Signalsequenz.

BEISPIELE:25 **1. Bakterienstämme, Medien und Plasmide**

Gram-positive Bakterien des Stammes *Bacillus stearothermophilus* PV72
 wurden bei 58°C in SVIII-Medium (Bartelmus und Perschak, Z.Zuckerind.7
 (1957), 276-281) kultiviert. E.coli Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert
 30 (Sambrook et al., (1989), supra). Zur Selektion von Transformanten wurde
 Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium zu-

- 19 -

gegeben. Das Plasmid pPLcAT10 (λ pL, bla, colE1) (Stanssens et al., Gen 36 (1985), 211-223) wurde als Klonierungsvektor verwendet.

2. Manipulation von DNA-Fragmenten

5

Restriktionsanalyse von DNA, Agarosegelelektrophorese und Klonierung von DNA-Fragmenten wurden nach den bei Sambrook et al. (1989), supra, beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

10

Die Transformation von kompetenten Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung eines Bio-Rad Genepulsers (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalif., USA) nach Protokollen des Herstellers.

15

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert. Chromosomale DNA wurde gemäß der bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology (1987), New York, John Wiley) beschriebenen Verfahren isoliert.

20

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, New England Biolabs oder Stratagene bezogen und gemäß den Vorschriften der Hersteller eingesetzt.

3. DNA-Sequenzierung

25

Die Sequenzanalyse von DNA-Molekülen erfolgte nach der Didesoxyketten-terminationsmethode von Sanger et al.. Die zur Sequenzierung des sbsA-Gens verwendeten Primer wurden auf Basis der bereits publizierten sbsA-Sequenz (Kuen et al., Gene 145 (1994), 115-120) konstruiert.

30

- 20 -

4. PCR-Amplifikation von sbsA

Die PCR-Amplifikation des sbsA-Gens erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l, in dem 200 μ M Desoxynukleotide, 1U Pfu-Polymerase (Stratagene), 1x Pfu-Reaktionspuffer, jeweils 0.5 μ M Oligonukleotidprimer und 100 ng genomischer DNA aus *B.stearothermophilus* als Matrize vorhanden waren. Die Amplifikation wurde über 30 Zyklen in einem Thermocycler (Biomed Thermocycler 60) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt von 1,5 min bei 95°C, einem Annealingschritt von 1 min bei 56°C und 1 min bei 50°C sowie einem Extensionsschritt von 2 min bei 72°C.

Als Primer wurden der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO.3 angegebene Primer T5-X, der den 5'-Bereich von sbsA flankiert und eine XbaI-Stelle enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO.4 gezeigte Primer E verwendet, der die 20 Nukleotide stromabwärts gelegene Region des Transkriptionsterminators der sbsA-Sequenz flankiert und eine BamHI-Stelle enthält.

Die PCR-amplifizierten Produkte wurden auf einem 0.8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Klonierung unter Verwendung des Systems von Gene Clean (BIO101 La Jolla, Kalif., USA) zur Klonierung gereinigt.

5. Klonierung des sbsA-Gens in den Vektor pPLcAT10

Das durch PCR gewonnene sbsA-Gen mit einer Länge von 3,79 kb wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und BamHI gespalten. Das resultierende XbaI-BamHI-Fragment wurde in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pPLcAT10 kloniert, so daß das sbsA-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des stromaufwärts gelegenen pL-Promotors war. Das ATG-Startkodon der sbsA-Sequenz wurde durch die Klonierungs-

- 21 -

prozedur rekonstruiert. Die klonierte sbsA-Sequenz enthielt die N-terminale Signalsequenz von sbsA und endete 20 nt nach dem Transkriptionsterminator. Nach Ligation der Vektor-DNA mit dem sbsA-Fragment wurde der E.coli-Stamm pop2135 (DSM10509) durch Elektrotransformation transformiert. Die resultierenden Klone wurden einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen. Ein positiver Klon wurde sequenziert, um die korrekten Sequenzübergänge an den 5'- und 3'-Enden zu verifizieren. Dieser Klon wurde als pBK4 bezeichnet.

- 10 Eine schematische Darstellung des 3,79 kb XbaI sbsA-Fragments und seine Lokalisierung in der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pBK4 ist in Fig.1 dargestellt (Abkürzungen: tT: Transkriptionsterminator; ori: Ursprung der DNA-Replikation; amp: Ampicillinresistenzgen).

15 6. Rekombinante Expression des sbsA-Gens im Cytoplasma von E.coli (Vergleichsbeispiel)

E.coli pop2135/pBK4-Zellen wurden bei 28°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Dann wurde die Expression von sbsA durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 28°C auf 42°C induziert. 1,5 ml Aliquots wurden vor bzw. 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression entnommen. Als Kontrollen wurden E.coli pop2135/pPLcAT10 (kultiviert unter den gleichen Bedingungen) und B.stearothermophilus PV72 verwendet.

25 Kulturüberstände und Zellextrakte aus allen Proben wurden auf die Expression des S-Layer-Proteins durch SDS-PAGE und Western-Immunoblotting untersucht.

30 Für den Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen Antiserum gegen SbsA aus Kaninchen inkubiert. Die Herstellung dieses Antiserums ist bei Egelseer t

- 22 -

al. (J.Bacteriol.177 (1995), 1444-1451) beschrieben. Zum Nachweis gebundener SbsA-spezifischer Antikörper wurde ein Konjugat aus Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase verwendet.

5 In cytoplasmatischen Extrakten aus mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen wurde eine zusätzliche starke Proteinbande mit etwa dem gleichen Molekulargewicht wie das Wildtyp-SbsA-Protein gefunden.

10 Aus Überständen von mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen konnte auch nach Induktion der sbsA-Gen-Expression kein SbsA-Protein nachgewiesen werden. Daraus ist ersichtlich, daß SbsA nicht in das umgebende Medium exportiert wird.

7. Sekretion des SbsA-Proteins ins Periplasma

15

Das sbsA-Gen wurde ohne Signalsequenz und mit Stopkodon am 3'-Ende in den Polylinker des kommerziell erhältlichen Plasmids pMAL-P2 (New England Biolabs) kloniert (Fig. 2). Das resultierende Plasmid pMAL-A enthält unter Kontrolle des taq-Promotors ein Fusionsgen, umfassend das malE-Gen
20 einschließlich dessen Signalsequenz sowie das sbsA-Gen ohne dessen Signalsequenz. Zwischen den beiden Domänen ist eine Faktor Xe Spaltungsstelle angeordnet.

Eine Analyse des Rohextrakts von mit pMAL-A transformierten E.coli DH5 α -
25 Zellen (Hanahan (1983) supra) zeigte die Expression eines MalE-SbsA Fusionspolypeptids mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa in der durch eine kalte osmotische Schockprozedur (Neu und Heppel, J. Biol. Chem. 240 (1965); 3685-3692) erzeugten periplasmatischen Fraktion des Zellextrakts. Die Nukleotidsequenz des malE-sbsA-Fusionsgens ist in Fig. 4
30 dargestellt. Die malE-Signalsequenz ist in SEQ ID NO. 7 g zeigt.

B. Sekretion des SbsA-Proteins in den extrazellulären Raum

Das Plasmid pCant-A wurde hergestellt durch Klonierung des sbsA-Gens ohne eigene Signalsequenz und mit Stopcodon am 3'-Ende in das mit SfiI und NotI geschnittenen, kommerziell erhältlichen Plasmids pCANTAB5E (Pharmacia Biotech). Es enthält unter Kontrolle des lac-Promotors (Plac) die Signalsequenz von Gen 3 des Bakteriophagen fd (45 nt) fusioniert mit dem sbsA-Gen ohne dessen eigene Signalsequenz (Fig. 3). Die Nukleotidsequenz des Fusionsgens ist in Fig. 5 dargestellt. Die fdGen3 Signalsequenz ist in SEQ ID NO. 8 gezeigt.

Im Kulturüberstand von mit pCant-A transformierten E.coli HB2151 Zellen (Pharmacia Biotech) konnte das SbsA-Protein nachgewiesen werden.

9. Sekretion des SbsB-Proteins in das Periplasma und in den extrazellulären Raum

Des sbsB-Gen wurde - wie in den Beispielen 7 und 8 beschrieben - ohne eigene Signalsequenz in die Plasmide pMAL-P2 und pCANTAB5E kloniert, wobei die Plasmide pMAL-B und pCant-B erhalten wurden.

In mit den Plasmiden pMAL-B und pCant-B transformierten E.coli-Zellen konnte eine Sekretion des SbsB-Proteins in das Periplasma und in den extrazellulären Raum gezeigt werden.

- 24 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- 5 (i) ANMELDER:
(A) NAME: Werner Lubitz
(B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7
(C) ORT: Wien
(E) LAND: Austria
10 (F) POSTLEITZAHL: 1080
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Sekretion von S-
Layer-Proteinen in
das Periplasma und in
15 den extrazellulären
Raum
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6
- 20 (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 3687 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
35 (D) TOPOLOGIE: linear
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
(B) STAMM: PV72
40
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) CLON(E): sbsA
- 45 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 1..3684
- 50 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
(B) LAGE: 1..90
- 55

- 25 -

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:91..3684

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

10	ATG GAT AGG AAA AAA GCT GTG AAA CTA GCA ACA GCA AGT GCT ATT GCA Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala -30 -25 -20 -15	48
15	GCA AGT GCA TTT GTC GCT GCA AAT CCA AAC GCT TCT GAA GCG GCT ACA Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr -10 -5 1	96
20	CAT GTA GCA ACA GTA GTA AGC CAA GCA AAA GCA CAG TTC AAA AAA GCA Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala 5 10 15	144
25	TAC TAT ACT TAC AGC CAT ACA GTA ACG GAA ACT GGT GAA TTC CCA AAC Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn 20 25 30	192
30	ATT AAC GAT GTA TAT GCT GAA TAC AAC AAA GCG AAA AAA CGA TAC CGT Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg 35 40 45 50	240
35	GAT GCG GTA GCA TTA GTG AAT AAA GCA GGT GGC GCG AAA AAA GAC GCT Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala 55 60 65	288
40	TAC TTA GCT GAT TTA CAA AAA GAA TAT GAA ACT TAC GTT TTC AAA GCA Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala 70 75 80	336
45	AAC CCT AAA TCT GGC GAA GCT CGT GTA GCA ACT TAC ATC GAT GCT TAC Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr 85 90 95	384
50	AAC TAT GCA ACA AAA TTA GAC GAA ATG CGC CAA GAG CTA GAG GCT GCT Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala 100 105 110	432
55	GTT CAA GCA AAA GAT TTA GAA AAA GCA GAA CAA TAC TAT CAC AAA ATT Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile 115 120 125 130	480
60	CCT TAT GAA ATT AAA ACT CGC ACA GTC ATT TTA CAT CGC GTA TAT GGT Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly 135 140 145	528
65	AAA ACA ACT CGT GAT TTA CTT CGC TCT ACA TTT AAA GCA AAA GCA CAA Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Als Lys Ala Gln 150 155 160	576
70	GAA CTT CGC GAC AGC TTA ATT TAT GAT ATT ACC GTT GCA ATG AAA GCG Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala 165 170 175	624
75	CGC GAA GTA CAA GAC GCT GTG AAA GCA GGC AAT TTA GAC AAA GCT AAA Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys 180 185 190	672
80	GCT GCT GTT GAT CAA ATC AAT CAA TAC TTA CCA AAA GTA ACA CAT GCT Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala 195 200 205 210	720
85	TTC AAA ACT GAA CTA ACA GAA GTA GCG AAA AAA GCA TTA CAT GCA GAT Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp 215 220 225	768

- 26 -

	GAA GCT GCG CTT ACT CCA AAA GTT GAA AGT GTA AGT GCG ATT AAC ACT Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr 230 235 240	816
5	CAA AAC AAA GCT GTT GAA TTA ACA GCA GTA CCA GTG AAC GGA ACA CTA Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu 245 250 255	864
10	AAA TTA CAA CTT TCA GCT GCT GCA AAT GAA GAT ACA GTA AAC GTA AAT Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn 260 265 270	912
15	ACT GTA CGT ATC TAT AAA GTG GAC GGT AAC ATT CCA TTT GCC CTT AAT Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn 275 280 285 290	960
	ACG GCA GAT GTT TCT TTA TCT ACA GAC GGA AAA ACT ATC ACT GTG GAT Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp 295 300 305	1008
20	GCT TCA ACT CCA TTC GAA AAT AAT ACG GAG TAT AAA GTA GTA GTT AAA Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys 310 315 320	1056
25	GGT ATT AAA GAC AAA AAT GGC AAA GAA TTT AAA GAA GAT GCA TTC ACT Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr 325 330 335	1104
30	TTC AAG CTT CGA AAT GAT GCT GTA GTT ACT CAA GTG TTT GGA ACT AAT Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn 340 345 350	1152
35	GTA ACA AAC AAC ACT TCT GTA AAC TTA GCA GCA GGT ACT TTC GAC ACT Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr 355 360 365 370	1200
	GAC GAT ACT TTA ACA GTA GTA TTT GAT AAG TTG TTA GCA CCT GAA ACT Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr 375 380 385	1248
40	GTA AAC AGC TCG AAC GTT ACT ATT ACA GAT GTT GAA ACT GGA AAA CGC Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg 390 395 400	1296
45	ATT CCA GTA ATT GCA TCT ACT TCT GGT TCT ACA ATT ACT ATT ACG TTA Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu 405 410 415	1344
50	AAA GAA GCG TTA GTA ACT GGT AAA CAA TAT AAA CTT GCT ATC AAT AAT Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn 420 425 430	1392
55	GTT AAA ACA TTA ACT GGT TAC AAT GCA GAA GCT TAC GAG TTA GTG TTC Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe 435 440 445 450	1440
	ACT GCA AAC GCA TCA GCA CCA ACT GTT GCT ACC GCT CCT ACT ACT TTA Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu 455 460 465	1488
60	GGT GGT ACA ACT TTA TCT ACT GGT TCT CTT ACA ACA AAT GTT TGG GGT Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly 470 475 480	1536
65	AAA TTG GCT GGT GGT GTG AAT GAA GCT GGA ACT TAT TAT CCT GGT CTT Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu 485 490 495	1584
70	CAA TTC ACA ACA ACG TTT GCT ACT AAG TTA GAC GAA TCT ACT TTA GCT Gln Phe Thr Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Als 500 505 510	1632

- 27 -

	GAT AAC TTT GTA TTA GTT GAA AAA GAA TCT GGT ACA GTT GTT GCT TCT Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser 515 520 525 530	1680
5	GAA CTA AAA TAT AAT GCA GAC GCT AAA ATG GTA ACT TTA GTG CCA AAA Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys 535 540 545	1728
10	GCG GAC CTT AAA GAA AAT ACA ATC TAT CAA ATC AAA ATT AAA AAA GGC Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly 550 555 560	1776
15	TTG AAG TCC GAT AAA GGT ATT GAA TTA GGC ACT GTT AAC GAG AAA ACA Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr 565 570 575	1824
20	TAT GAG TTC AAA ACT CAA GAC TTA ACT GCT CCT ACA GTT ATT AGC GTA Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val 580 585 590	1872
25	ACG TCT AAA AAT GGC GAC GCT GGA TTA AAA GTA ACT GAA GCT CAA GAA Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu 595 600 605 610	1920
30	TTT ACT GTG AAG TTC TCA GAG AAT TTA AAT ACA TTT AAT GCT ACA ACC Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr 615 620 625	1968
35	GTT TCG GGT AGC ACA ATC ACA TAC GGT CAA GTT GCT GTA GTA AAA GCG Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala 630 635 640	2016
40	GGT GCA AAC TTA TCT GCT CTT ACA GCA AGT GAC ATC ATT CCA GCT AGT Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser 645 650 655	2064
45	GTT GAA GCG GTT ACT GGT CAA GAT GGA ACA TAC AAA GTG AAA GTT GCT Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala 660 665 670	2112
50	GCT AAC CAA TTA GAA CGT AAC CAA GGG TAC AAA TTA GTA GTG TTC GGT Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly 675 680 685 690	2160
55	AAA GGT GCA ACA GCT CCT GTT AAA GAT GCT GCA AAT GCA AAT ACT TTA Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu 695 700 705	2208
60	GCA ACT AAC TAT ATC TAT ACA TTT ACA ACT GAA GGT CAA GAC GTA ACA Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr 710 715 720	2256
65	GCA CCA ACG GTT ACA AAA GTA TTC AAA GGT GAT TCT TTA AAA GAC GCT Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala 725 730 735	2304
70	GAT GCA GTT ACT ACA CTT ACG AAC GTT GAT GCA GGT CAA AAA TTC ACT Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr 740 745 750	2352
75	ATC CAA TTT AGC GAA GAA TTA AAA ACT TCT AGT GGT TCT TTA GTG GGT Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly 755 760 765 770	2400
80	GGC AAA GTA ACT GTC GAG AAA TTA ACA AAC AAC GGA TGG GTA GAT GCT Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala 775 780 785	2448
85	GGT ACT GGA ACA ACT GTA TCA GTT GCT CCT AAG ACA GAT GCA AAT GGT Gly Thr Gly Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly 790 795 800	2496

- 28 -

	AAA GTA ACA GCT GCT GTG GTT ACA TTA ACT GGT CTT GAC AAT AAC GAC Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp 805 810 815	2544
5	AAA GAT GCG AAA TTG CGT CTG GTA GTA GAT AAG TCT TCT ACT GAT GGA Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly 820 825 830	2592
10	ATT GCT GAT GTA GCT GGT AAT GTA ATT AAG GAA AAA GAT ATT TTA ATT Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile 835 840 845 850	2640
15	CGT TAC AAC AGC TGG AGA CAC ACT GTA GCT TCT GTG AAA GCT GCT GCT Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Als 855 860 865	2688
20	GAC AAA GAT GGT CAA AAC GCT TCT GCT GCA TTC CCA ACA AGC ACT GCA Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Als Als Phe Pro Thr Ser Thr Ala 870 875 880	2736
25	ATT GAT ACA ACT AAG AGC TTA TTA GTT GAA TTC AAT GAA ACT GAT TTA Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu 885 890 895	2784
30	GCG GAA GTT AAA CCT GAG AAC ATC GTT GTT AAA GAT GCA GCA GGT AAT Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn 900 905 910	2832
35	GCG GTA GCT GGT ACT GTA ACA GCA TTA GAC GGT TCT ACA AAT AAA TTT Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe 915 920 925 930	2880
40	GTA TTC ACT CCA TCT CAA GAA TTA AAA GCT GGT ACA GTT TAC TCT GTA Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val 935 940 945	2928
45	ACA ATT GAC GGT GTG AGA GAT AAA GTA GGT AAC ACA ATC TCT AAA TAC Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr 950 955 960	2976
50	ATT ACT TCG TTC AAG ACT GTA TCT GCG AAT CCA ACG TTA TCT TCA ATC Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile 965 970 975	3024
55	AGC ATT GCT GAC GGT GCA GTT AAC GTT GAC CGT TCT AAA ACA ATT ACA Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr 980 985 990	3072
60	ATT GAA TTC AGC GAT TCA GTT CCA AAC CCA ACA ATC ACT CTT AAG AAG Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys 995 1000 1005 1010	3120
65	GCT GAC GGA ACT TCA TTT ACT AAT TAC ACT TTA GTA AAT GTA AAT AAT Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn 1015 1020 1025	3168
70	GAA AAT AAA ACA TAC AAA ATT GTA TTC CAC AAA GGT GTA ACA CTT GAC Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp 1030 1035 1040	3216
75	GAG TTT ACT CAA TAT GAG TTA GCA GTT TCA AAA GAT TTT CAA ACT GGT Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly 1045 1050 1055	3264
80	ACT GAT ATT GAT AGC AAA GTT ACA TTC ATC ACA GGT TCT GTT GCT ACT Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr 1060 1065 1070	3312
85	GAC GAA GTA AAA CCT GCT CTA GTA GGC GTT GGT TCA TGG AAT GGA ACA Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr 1075 1080 1085 1090	3360

- 29 -

AGC TAT ACT CAG GAT GCT GCA GCA ACA CGA CTT CGG TCT GTA GCT GAC 3408
 Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp
 1095 1100 1105

5 TTC GTT GCG GAG CCA GTT GCC CTT CAA TTC TCA GAA GGT ATC GAT TTA 3456
 Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu
 1110 1115 1120

10 ACG AAT GCA ACT GTG ACA GTA ACA AAT ATT ACT GAT GAT AAA ACT GTT 3504
 Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val
 1125 1130 1135

GAA GTT ATT TCA AAA GAG AGT GTA GAC GCA GAC CAT GAT GCA GGT GCT 3552
 Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala
 1140 1145 1150

15 ACT AAG GAG ACA TTA GTA ATT AAC ACA GTT ACT CCT TTA GTA CTT GAT 3600
 Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp
 1155 1160 1165 1170

20 AAC AGC AAG ACT TAT AAG ATT GTT GTA AGT GGA GTT AAA GAT GCA GCA 3648
 Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala
 1175 1180 1185

25 GGT AAT GTT GCA GAT ACT ATT ACA TTC TAT ATT AAG TAA 3687
 Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys
 1190 1195

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35 (A) LÄNGE: 1228 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala
 -30 -25 -20 -15

45 Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr
 -10 -5 1

Asp val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala
 5 10 15

50 Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn
 20 25 30

Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg
 35 40 45 50

Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala
 55 60 65

60 Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala
 70 75 80

Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr
 85 90 95

65 Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala
 100 105 110

- 30 -

Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile
 115 120 125 130
 5 Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly
 135 140 145
 Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln
 150 155 160
 10 Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala
 165 170 175
 Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys
 180 185 190
 15 Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala
 195 200 205 210
 Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp
 215 220 225
 20 Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr
 230 235 240
 25 Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu
 245 250 255
 Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn
 260 265 270
 30 Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn
 275 280 285 290
 Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp
 295 300 305
 35 Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys
 310 315 320
 40 Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr
 325 330 335
 Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn
 340 345 350
 45 Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr
 355 360 365 370
 Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr
 375 380 385
 50 Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg
 390 395 400
 55 Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu
 405 410 415
 Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn
 420 425 430
 60 Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe
 435 440 445 450
 Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu
 455 460 465
 65

- 31 -

Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly
 470 475 480
 5 Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu
 485 490 495
 Gln Phe Thr Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala
 500 505 510
 10 Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser
 515 520 525 530
 Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys
 535 540 545
 15 Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly
 550 555 560
 Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr
 565 570 575
 Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val
 580 585 590
 25 Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu
 595 600 605 610
 Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr
 615 620 625
 30 Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala
 630 635 640
 Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser
 645 650 655
 35 Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala
 660 665 670
 40 Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly
 675 680 685 690
 Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu
 695 700 705
 45 Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr
 710 715 720
 50 Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala
 725 730 735
 Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr
 740 745 750
 55 Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly
 755 760 765 770
 Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala
 775 780 785
 60 Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly
 790 795 800
 65 Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp
 805 810 815

- 32 -

	Lys	Asp	Ala	Lys	Leu	Arg	Leu	Val	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Asp	Gly
	820						825					830				
5	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Gly	Asn	Val	Ile	Lys	Glu	Lys	Asp	Ile	Leu	Ile
	835					840					845					850
	Arg	Tyr	Asn	Ser	Trp	Arg	His	Thr	Val	Ala	Ser	Val	Lys	Ala	Ala	Ala
					855					860					865	
10	Asp	Lys	Asp	Gly	Gln	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala
				870					875					880		
	Ile	Asp	Thr	Thr	Lys	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Phe	Asn	Glu	Thr	Asp	Leu
			885					890					895			
15	Ala	Glu	Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Val	Lys	Asp	Ala	Ala	Gly	Asn
		900					905					910				
	Ala	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Thr	Ala	Leu	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Lys	Phe
20						920					925					930
	Val	Phe	Thr	Pro	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Tyr	Ser	Val
					935					940					945	
25	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Arg	Asp	Lys	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Ser	Lys	Tyr
				950					955					960		
	Ile	Thr	Ser	Phe	Lys	Thr	Val	Ser	Ala	Asn	Pro	Thr	Leu	Ser	Ser	Ile
			965					970					975			
30	Ser	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala	Val	Asn	Val	Asp	Arg	Ser	Lys	Thr	Ile	Thr
		980					985				990					
	Ile	Glu	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Pro	Asn	Pro	Thr	Ile	Thr	Leu	Lys	Lys
35		995				1000					1005					1010
	Ala	Asp	Gly	Thr	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	Val	Asn	Val	Asn	Asn
					1015					1020					1025	
40	Glu	Asn	Lys	Thr	Tyr	Lys	Ile	Val	Phe	His	Lys	Gly	Val	Thr	Leu	Asp
				1030					1035					1040		
	Glu	Phe	Thr	Gln	Tyr	Glu	Leu	Ala	Val	Ser	Lys	Asp	Phe	Gln	Thr	Gly
45			1045					1050					1055			
	Thr	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Val	Thr	Phe	Ile	Thr	Gly	Ser	Val	Ala	Thr
		1060					1065					1070				
50	Asp	Glu	Val	Lys	Pro	Ala	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Ser	Trp	Asn	Gly	Thr
		1075				1080					1085				1090	
	Ser	Tyr	Thr	Gln	Asp	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Leu	Arg	Ser	Val	Ala	Asp
					1095				1100						1105	
55	Phe	Val	Ala	Glu	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Phe	Ser	Glu	Gly	Ile	Asp	Leu
			1110					1115						1120		
	Thr	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Thr	Asn	Ile	Thr	Asp	Asp	Lys	Thr	Val
60			1125					1130					1135			
	Glu	Val	Ile	Ser	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Asp	His	Asp	Ala	Gly	Ala
		1140					1145					1150				
65	Thr	Lys	Glu	Thr	Leu	Val	Ile	Asn	Thr	Val	Thr	Pro	Leu	Val	Leu	Asp
		1155				1160					1165					1170

- 33 -

Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala
 1175 1180 1185

5 Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys
 1190 1195

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

10

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 15 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

20

TTAATCGATT CTAGATGGAT AGGAAAAAAG CTG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

25

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 30 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

35

ATACCCGGGG GTACGGATCC GATACAGATT TGAGCAA

37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

40

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 2766 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 45 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

50

- (A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
 (B) STAMM: PV72

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

55

- (B) CLON(E): sbsB

- 34 -

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:1..2763

5

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
 (B) LAGE:1..93

10

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE:94..2763

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

	ATG GCT TAT CAA CCT AAG TCT TTT CGC AAG TTT GTT GCG ACA ACT GCA	48
20	Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala -31 -30 -25 -20	
	ACA GCT GCC ATT GTA GCA TCT GCG GTA GCT CCT GTA GTA TCT GCA GCA	96
25	Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala -15 -10 -5 1	
	AGC TTC ACA GAT GTT GCG CCG CAA TAT AAA GAT GCG ATC GAT TTC TTA	144
	Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu 5 10 15	
30	GTA TCA ACT GGT GCA ACA AAA GGT AAA ACA GAA ACA AAA TTC GGC GTT	192
	Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val 20 25 30	
35	TAC GAT GAA ATC ACT CGT CTA GAT GCG GCA GTT ATT CTT GCA AGA GTA	240
	Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val 35 40 45	
40	TTA AAA CTA GAC GTT GAC AAC GCA AAA GAC GCA GGC TTC ACA GAT GTG	288
	Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val 50 55 60 65	
45	CCA AAA GAC CGT GCA AAA TAC GTC AAC GCG CTT GTA GAA GCT GGC GTA	336
	Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val 70 75 80	
	TTA AAC GGT AAA GCA CCT GGC AAA TTT GGT GCA TAC GAC CCA TTA ACT	384
	Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr 85 90 95	
50	CGC GTT GAA ATG GCA AAA ATC ATC GCG AAC CGT TAC AAA TTA AAA GCT	432
	Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala 100 105 110	
55	GAC GAT GTA AAA CTT CCA TTC ACT GAT GTA AAC GAT ACA TGG GCA CCA	480
	Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro 115 120 125	
60	TAC GTA AAA GCG CTT TAT AAA TAC GAA GTA ACC AAA AGG TTA AAA CAC	528
	Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His 130 135 140 145	
	CAA CAA GCT TCG GTG CAT ACC AAA AAC ATC ACT CTG CGT GAC TTT GCG	576
65	Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala 150 155 160	
	CAA TTT GTA TAT AGA GCG GTG AAT ATT AAT GCA GTG CCA GAA ATA GTT	624
	Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val 165 170 175	

- 35 -

	GAA GTA ACT GCG GTT AAT TCG ACT ACA GTG AAA GTA ACA TTC AAT ACG Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr 180 185 190	672
5	CAA ATT GCT GAT GTT GAT TTC ACA AAT TTT GCT ATC GAT AAC GGT TTA Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu 195 200 205	720
10	ACT GTT ACT AAA GCA ACT CTT TCT CGT GAT AAA AAA TCC GTA GAG GTT Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val 210 215 220 225	768
15	GTG GTA AAT AAA CCG TTT ACT CGT AAT CAG GAA TAT ACA ATT ACA GCG Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala 230 235 240	816
	ACA GGC ATT AAA AAT TTA AAA GGC GAG ACC GCT AAG GAA TTA ACT GGT Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly 245 250 255	864
20	AAG TTT GTT TGG TCT GTT CAA GAT GCG GTA ACT GTT GCA CTA AAT AAT Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn 260 265 270	912
25	AGT TCG CTT AAA GTT GGA GAG GAA TCT GGT TTA ACT GTA AAA GAT CAG Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln 275 280 285	960
30	GAT GGC AAA GAT GTT GTA GGT GCT AAA GTA GAA CTT ACT TCT TCT AAT Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn 290 295 300 305	1008
35	ACT AAT ATT GTT GTA GTT TCA AGT GGC GAA GTA TCA GTA TCT GCT GCT Thr Asn Ile Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala 310 315 320	1056
	AAA GTT ACA GCT GTA AAA CCG GGA ACA GCT GAT GTT ACT GCA AAA GTT Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val 325 330 335	1104
40	ACA TTA CCA GAT GGT GTT GTA CTA ACA AAT ACA TTT AAA GTG ACA GTT Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val 340 345 350	1152
45	ACA GAA GTG CCT GTT CAA GTC CAA AAT CAA GGA TTT ACT TTA GTT GAT Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp 355 360 365	1200
50	AAT CTT TCT AAT GCT CCA CAG AAT ACA GTT GCA TTT AAC AAA GCT GAG Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu 370 375 380 385	1248
55	AAA GTA ACT TCA ATG TTT GCT GGA GAA ACT AAA ACA GTT GCA ATG TAT Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr 390 395 400	1296
	GAT ACT AAA AAC GGT GAT CCT GAA ACT AAA CCT GTT GAT TTC AAA GAT Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp 405 410 415	1344
60	GCA ACT GTA CGT TCA TTA AAT CCA ATT ATT GCA ACA GCT GCT ATT AAT Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn 420 425 430	1392
65	GGT AGT GAG CTC CTT GTC ACA GCT AAT GCT GGC CAA TCT GGA AAA GCT Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala 435 440 445	1440
70	TCA TTT GAA GTA ACA TTA AAA GAT AAT ACA AAA AGA ACA TTT ACA GTT Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val 450 455 460 465	1488

- 36 -

	GAT GTA AAA AAA GAC CCT GTA TTA CAA GAT ATA AAA GTA GAT GCA ACT Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr 470 475 480	1536
5	TCT GTT AAA CTT TCC GAT GAA GCT GTT GGC GGC GGG GAA GTT GAA GCA Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly 485 490 495	1584
10	GTT AAC CAA AAA ACG ATT AAA GTA AGT GCA GTT GAC CAA TAC GGT AAA Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys 500 505 510	1632
15	GAA ATT AAA TTT GGT ACA AAA GGT AAA GTT ACT GTT ACA ACT AAT ACA Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr 515 520 525	1680
20	GAA GGA CTA GTT ATT AAA AAT GTA AAT AGC GAT AAT ACA ATT GAC TTT Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe 530 535 540 545	1728
25	GAT AGC GGC AAT AGT GCA ACT GAC CAA TTT GTT GTC GTT GCA ACA AAA Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys 550 555 560	1776
30	GAC AAA ATT GTC AAT GGT AAA GTA GAA GTT AAA TAT TTC AAA AAT GCT Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala 565 570 575	1824
35	AGT GAC ACA ACA CCA ACT TCA ACT AAA ACA ATT ACT GTT AAT GTA GTA Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val 580 585 590	1872
40	AAT GTA AAA GCT GAC GCT ACA CCA GTA GGA TTA GAT ATT GTA GCA CCT Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro 595 600 605	1920
45	TCT AAA ATT GAT GTA AAT GCT CCA AAC ACT GCT TCT ACT GCA GAT GTT Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val 610 615 620 625	1968
50	GAT TTT ATA AAT TTC GAA AGT GTT GAG ATT TAC ACA CTC GAT TCA AAT Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn 630 635 640	2016
55	GGT AGA CGT CAA AAA AAA GTT ACT CCA ACT GCA ACT ACA CTT GTA GGT Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly 645 650 655	2064
60	ACA AAA AAA AAA AAA AAA GTT AAT GGG AAT GTA TTA CAA TTC AAG GGG Thr Lys Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly 660 665 670	2112
65	AAC GAA GAA TTA ACG CTA TCA ACT TCT TCT AGT ACA GGA AAC GTA GAT Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp 675 680 685	2160
70	GGA ACA GCA GAA GGA ATG ACA AAA CGT ATT CCA GGG AAA TAT ATC AAC Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn 690 695 700 705	2208
75	TCT GCA AGT GTA CCT GCC AGT GCA ACA GTA GCA ACA AGT CCT GTT ACT Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr 710 715 720	2256
80	GTA AAG CTT AAT TCA AGT GAT AAT GAT TTA ACA TTT GAA GAA TTA ATA Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile 725 730 735	2304
85	TTC GGT GTA ATT GAC CCT ACA CAA TTA GTC AAA GAT GAA GAC ATC AAC Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn 740 745 750	2352

- 37 -

GAA TTT ATT GCA GTT TCA AAA GCG GCT AAA AAT GAT GGA TAT TTG TAT 2400
 Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr
 755 760 765
 5 AAT AAA CCG CTT GTA ACG GTT AAA GAT GCA TCA GGA AAA GTT ATT CCA 2448
 Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro
 770 775 780 785
 10 ACA GGT GCA AAT GTT TAC GGT CTA AAT CAT GAT GCA ACT AAC GGA AAC 2496
 Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn
 790 795 800
 15 ATT TGG TTT GAT GAG GAA CAA GCT GGC TTA GCT AAA AAA TTT AGT GAT 2544
 Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp
 805 810 815
 20 GTA CAT TTT GAT GTT GAT TTT TCA TTA ACT AAC GTT GTA AAA ACT GGT 2592
 Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly
 820 825 830
 AGC GGT ACA GTT TCT TCA TCG CCA TCA TTA TCT GAC GCA ATT CAA CTT 2640
 Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu
 835 840 845
 25 ACT AAT TCA GGC GAT GCA GTA TCG TTT ACA TTA GTT ATC AAA TCA ATT 2688
 Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile
 850 855 860 865
 30 TAT GTT AAA GGC GCA GAT AAA GAT GAT AAT AAC TTA CTT GCA GCC CCT 2736
 Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro
 870 875 880
 35 GTT TCT GTC AAT GTG ACT GTG ACA AAA TAA 2766
 Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
 885 890

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

40

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 921 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala
 -31 -30 -25 -20
 55 Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala 1
 -15 -10 -5
 Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu
 5 10 15
 60 Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val
 20 25 30
 Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val
 35 40 45
 65 Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val
 50 55 60 65

70

- 38 -

Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val
 70 75 80
 5 Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr
 85 90 95
 Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala
 100 105 110
 10 Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro
 115 120 125
 Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His
 130 135 140 145
 15 Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala
 150 155 160
 Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val
 165 170 175
 20 Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr
 180 185 190
 25 Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu
 195 200 205
 Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val
 210 215 220 225
 30 Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala
 230 235 240
 Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly
 245 250 255
 35 Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn
 260 265 270
 40 Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln
 275 280 285
 Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn
 290 295 300 305
 45 Thr Asn Ile Val Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala
 310 315 320
 Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val
 325 330 335
 50 Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val
 340 345 350
 55 Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp
 355 360 365
 Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu
 370 375 380 385
 60 Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr
 390 395 400
 Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp
 405 410 415
 65 Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn
 420 425 430
 70 Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala
 435 440 445
 Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val
 450 455 460 465

- 39 -

Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr
 470 475 480
 5 Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly
 485 490 495
 Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys
 500 505 510
 10 Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr
 515 520 525
 Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe
 530 535 540 545
 15 Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys
 550 555 560
 20 Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala
 565 570 575
 Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val
 580 585 590
 25 Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro
 595 600 605
 30 Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val
 610 615 620 625
 Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn
 630 635 640
 35 Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly
 645 650 655
 Thr Lys Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly
 660 665 670
 40 Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp
 675 680 685
 45 Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn
 690 695 700 705
 Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr
 710 715 720
 50 Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile
 725 730 735
 Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn
 740 745 750
 55 Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr
 755 760 765
 60 Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro
 770 775 780 785
 Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn
 790 795 800
 65 Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp
 805 810 815
 Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly
 820 825 830
 70 Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu
 835 840 845

- 40 -

Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile
850 855 860 865

5 Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro
870 875 880

Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
885 890

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15

- (A) LÄNGE: 75 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ATGAAAATRA AAACAGGTGC ACGCATCCTC GCATTATCCG CATTACGAC
GATGATGTTT TCCGCCTCGG CTCTC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GTGAAAAAAT TATTATCGC AATTCCTTAA
GTTGTTCTT TCTAT

40

- 41 -

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (e) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer Signalsequenz, die für ein Peptid kodiert, das eine Integration des S-Layer-Proteins in der äußeren Membran der Wirtszelle, eine Integration des S-Layer-Proteins in der cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle, eine Sekretion des S-Layer-Proteins in den periplasmatischen Raum der Wirtszelle oder/und eine Sekretion in das die Wirtszelle umgebende Medium bewirkt,
 - (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und
 - (c) gegebenenfalls das resultierende Polypeptid aus der äußeren Membran der Wirtszelle, aus der cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle, aus dem periplasmatischen Raum der Wirtszelle oder/und aus dem die Wirtszelle umgebenden Medium gewinnt.
2. Verfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (a) eine eukaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure vorzugsweise in operativer Verknüpfung mit einer Signalsequenz, die eine Integration des S-Layer-Proteins in

- 42 -

der cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle, eine Integration des S-Layer-Proteins in einer Organelle der Wirtszelle oder/und eine Sekretion in das die Wirtszelle umgebende Medium bewirkt,

5

- (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und
- (c) gegebenenfalls das resultierende Polypeptid aus der cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle, einer Organelle der Wirtszelle oder/und aus dem die Wirtszelle umgebenden Medium gewinnt.

10

- 3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine E.coli-Wirtszelle verwendet.

15

- 4. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Insekten-, Säuger- oder Hefezelle verwendet.

20

- 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert, ausgewählt wird aus

25

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 91 bis 3684 in SEQ ID No.1 gezeigte Nukleotidsequenz umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

30

- 43 -

- (iii) ein r Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert, ausgewählt wird aus
- 10 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 94 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz umfaßt,
 - (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz umfaßt und
 - 15 (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure eine oder mehrere Insertionen enthält, die für heterologe Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionsstelle an Position 562, 585, 881, 920, 1087, 1813, 1947, 2295, 2652, 3046, 3484 oder/und 3594 der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleotidsequenz lokalisiert ist.

- 44 -

9. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionsstelle an Position 410, 484, 598, 1012, 1435,
1583, 1808 oder/und 2301 der in SEQ ID No. 5 gezeigten Nukleo-
tidsequenz lokalisiert ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen ausgewählt werden aus Nukleotidsequenzen,
die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäu-
ren oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, metallbindende
Epitope, immunogene Epitope, allergene Epitope, antigene Epitope,
Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine
kodieren.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen für Streptavidin kodieren.
12. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen für immunogene Epitope aus Herpesviren,
insbesondere Herpesvirus 1 oder 6, FMDV, Flaviviren oder Filovi-
ren kodieren.
13. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen für Enzyme, wie etwa Polyhydroxybuttersäure-
synthase oder bakterielle Luciferase, kodieren.

- 45 -

14. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone
oder Tumornekrosefaktoren, kodieren.
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa
Protein A oder Protein G, kodieren.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen für antigene Epitope kodieren, die an Cytokine
oder Endotoxine binden.
- 15 17. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen für metallbindende Epitope kodieren.
- 20 18. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Insertionen ausgewählt werden aus Nukleotidsequenzen,
die für Cysteinreste kodieren.
- 25 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß 5'-seitig der für das S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure
in operativer Verknüpfung eine Nukleinsäure angeordnet ist, die für
ein Signalpeptid aus gram-negativen prokaryontischen Zellen
30 kodiert.

- 46 -

20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure
- 5 (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID No. 7
oder 8 dargestellten Nukleotidsequenz,
(b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des
genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/-
und
(c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens
- 10 80% homologe Nukleotidsequenz umfaßt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß 5'-seitig der für das S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure
- 15 in operativer Verknüpfung eine Nukleinsäure angeordnet ist, die für
ein Signalpeptid aus eukaryontischen Zellen kodiert.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß in der Wirtszelle mindestens zwei S-Layer-Gene exprimiert
- 20 werden, wobei eines davon für ein modifiziertes S-Layer-Protein
und ein anderes für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert.
23. Verfahren nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
- 25 daß das modifizierte S-Layer-Protein in der Lage ist, eine mit dem
nichtmodifizierten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur
auszubilden.

- 47 -

24. Nukleinsäure,

dadurch gekennzeichnet,

daß sie für ein gegebenenfalls heterologe Peptid- oder Polypeptid-
insertionen enthaltendes S-Layer-Protein kodiert und in operativer
Verknüpfung mit einer Signalsequenz ist, die für ein Peptid kodiert,
das

(a) eine Integration in die äußere Membran einer gramnegativen
prokaryontischen Wirtszelle, eine Integration in die cytoplas-
matische Membran einer gram-negativen prokaryontischen
Wirtszelle, eine Sekretion des S-Layer-Proteins in den peri-
plasmatischen Raum einer gram-negativen prokaryontischen
Wirtszelle oder/und eine Sekretion in das extrazelluläre
Medium einer gram-negativen prokaryontischen Wirtszelle
oder

(b) eine Integration in die cytoplasmatische Membran einer
eukaryontischen Wirtszelle, eine Integration in eine Orga-
nelle einer eukaryontischen Wirtszelle oder/und eine Sekre-
tion in das extrazelluläre Medium einer eukaryontischen
Wirtszelle bewirkt.

25. Vektor,

dadurch gekennzeichnet,

daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch
23 enthält.

26. Gram-negative prokaryontische oder eukaryontische Zelle,

dadurch gekennzeichnet,

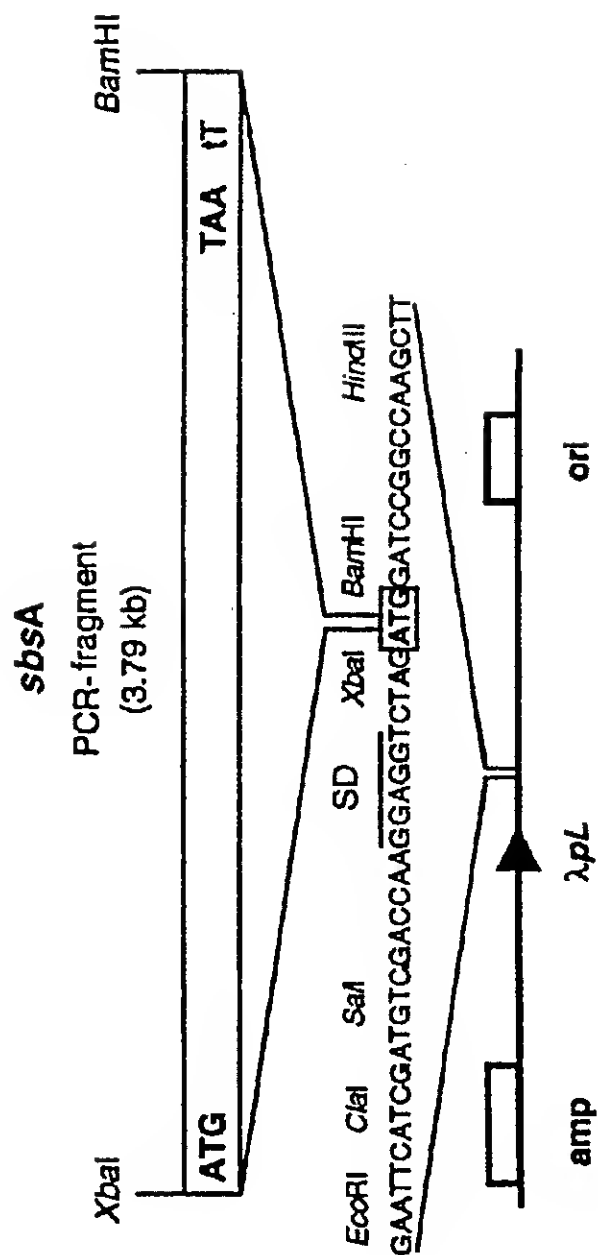
daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 24 oder einem
Vektor nach Anspruch 25 transformiert ist.

- 48 -

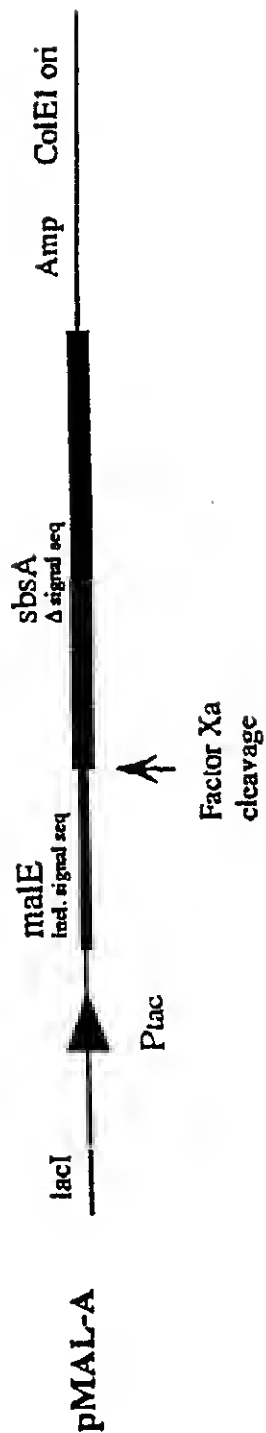
27. Zelle nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine E.coli-Zelle ist.
- 5 28. Prokaryontische Zelle nach Anspruch 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine S-Layer-Struktur im periplasmatischen Raum oder/und
verankert in der cytoplasmatischen Membran enthält.
- 10 29. Zelle nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Säuger-, Insekten- oder/und Hefezelle ist.
- 15 30. Eukaryontische Zelle nach Anspruch 26 oder 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine S-Layer-Struktur verankert in der cytoplasmatischen
Membran oder/und integriert in eine Orangelle der Zelle enthält.

1/13

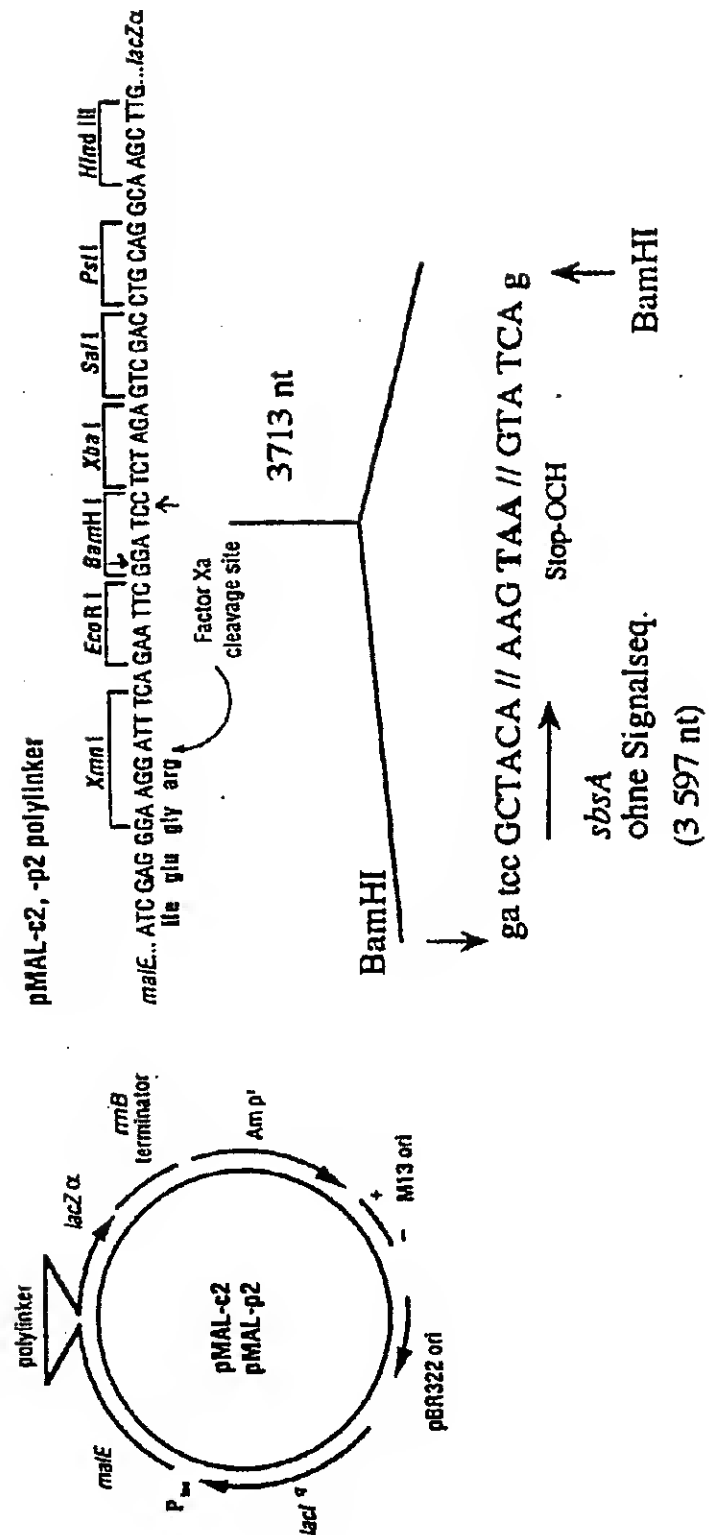
Figur 1



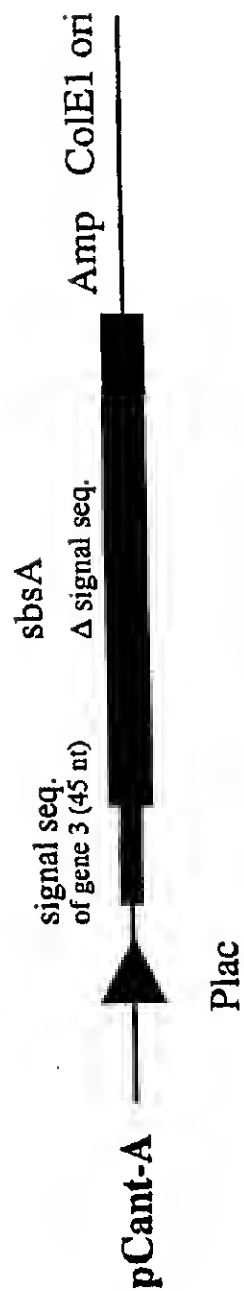
Figur 2



Fortsetzung Figur 2

Klonierungsstrategie**pMAL-p2 (New England Biolabs)
(6721 bp)**

Figur 3



5/13

Figur 4

Nukleotidsequenz eines SbsA-Gens fusioniert mit dem MaleE-Gen einschließlich dessen Signalsequenz (4988bp).
Klonierung: MaleE aus pMal-p2 mit SbsA (ohne ss) in BamHI von MCS

Merkmale:

Position 1249 bis 1254: BamHI-Schnittstelle
Position 4956 bis 4961: BamHI-Schnittstelle
Position 1255 bis 4851: SbsA-Gen ohne eigene Signalsequenz

Start MaleE-Gen mit Signalsequenz

ATGAAAATAA AAACAGGTGC ACGCATCCTC GCATTATCCG CATTACGAC GATGATGTTT	60
TCCGCCTCGG CTCTCGCCAA AATCGAAGAA GGTAAGTGG TAATCTGGAT TAACGGCGAT	120
AAAGGCTATA ACGGTCTCGC TGAAGTCGGT AAGAAATTCG AGAAAGATAC CGGAATTAAA	180
GTCACCGTTG AGCATCCGGA TAAACTGGAA GAGAAATTC CACAGGTGTC GGCAACTGGC	240
GATGGCCCTG ACATTATCTT CTGGGCACAC GACCGCTTTG GTGGCTACGC TCAATCTGGC	300
CTGTGGCTG AAATCACCCC GGACAAAGCG TTCCAGGACA AGCTGTATCC GTTACCTGG	360
GATGCCGTAC GTTACAACGG CAAGCTGATT GCTTACCCGA TCGCTGTTGA AGCGTTATCG	420
CTGATTTATA ACAAAGATCT GCTGCCGAAC CCGCCAAAAA CCTGGGAAGA GATCCCGGCG	480
CTGGATAAAG AACTGAAAGC GAAAGGTAAG AGCGCGCTGA TGTTCAACCT GCAAGAACCG	540
TACTTCACCT GGCCGCTGAT TGCTGCTGAC GGGGGTTATG CGTTCAAGTA TGAAAACGGC	600
AAGTACGACA TTAAAGACGT GGGCGTGGAT AACGCTGGCG CGAAAGCGGG TCTGACCTTC	660
CTGGTTGACC TGATTAAAAA CAAACACATG AATGCAGACA CCGATTACTC CATCGCAGAA	720
GCTGCCTTTA ATAAAGGCGA AACAGCGATG ACCATCAACG GCCCGTGGGC ATGGTCCAAC	780
ATCGACACCA GCAAATTGAA TTATGGTGTA ACGGTACTGC CGACCTTCAA GGGTCACCCA	840
TCCAAACCGT TCGTTGGCGT GCTGAGCGCA GGTATTAAAC CCGCCAGTCC GAACAAAGAG	900
TTGGCGAAAG AGTTCCTCGA AAATATCTG CTGACTGATG AAGGTCTGGA AGCGGTTAAT	960
AAAGACAAAC CGCTGGGTGC CGTAGCGCTG AAGTCTTACG AGGAAGAGTT GGCGAAAGAT	1020
CCACGTATTG CCGCCACCAT GGAAAACGCC CAGAAAGGTG AAATCATGCC GAACATCCCG	1080
CAGATGTCCG CTTTCTGGTA TGCCGTGCGT ACTGCGGTGA TCAACGCCGC CAGCGGTCGT	1140
CAGATCGTCG ATGAAGCCCT GAAAGACGCG CAGACTAATT CGAGCTCGAA CAACAACAAC	1200
AATAACAATA ACAACAACCT CGGGATCGAG GGAAGGATTT CAGAATTCGG <u>ATCCGCTACA</u>	1260
GATGTAGCAA CAGTAGTAAG CCAAGCAAAA GCACAGTTCA AAAAAGCATA CTATACTTAC	1320
AGCCATACAG TAACGGAAAC TGGTGAATTC CCAAACATTA ACGATGTATA TGCTGAATAC	1380

6/13

Fortsetzung Figur 4

AACAAAGCGA	AAAAACGATA	CCGTGATGCG	GTAGCATTAG	TGAATAAAGC	AGGTGGCGCG	1440
AAAAAAGACG	CTTACTTAGC	TGATTTACAA	AAAGAATATG	AACTTACGT	TTTCAAAGCA	1500
AACCCTAAAT	CTGGCGAAGC	TCGTGTAGCA	ACTTACATCG	ATGCTTACAA	CTATGCAACA	1560
AAATTAGACG	AAATGCGCCA	AGAGCTAGAG	GCTGCTGTTC	AAGCAAAAGA	TTTAGAAAAA	1620
GCAGAACAAT	ACTATCACAA	AATTCCTTAT	GAAATTAAAA	CTCGCACAGT	CATTTTAGAT	1680
CGCGTATATG	GTAAAACAAC	TCGTGATTTA	CTTCGCTCTA	CATTTAAAGC	AAAAGCACAA	1740
GAACTTCGCG	ACAGCTTAAT	TTATGATATT	ACCGTTGCAA	TGAAAGCGCG	CGAAGTACAA	1800
GACGCTGTGA	AAGCAGGCAA	TTTAGACAAA	GCTAAAGCTG	CTGTTGATCA	AATCAATCAA	1860
TACTTACCAA	AAGTAACAGA	TGCTTTCAAA	ACTGAACTAA	CAGAAGTAGC	GAAAAAAGCA	1920
TTAGATGCAG	ATGAAGCTGC	GCTTACTCCA	AAAGTTGAAA	GTGTAAGTGC	GATTAACTACT	1980
CAAAACAAAG	CTGTTGAATT	AACAGCAGTA	CCAGTGAACG	GAACACTAAA	ATTACAACCTT	2040
TCAGCTGCTG	CAAATGAAGA	TACAGTAAAC	GTAATACTG	TACGTATCTA	TAAAGTGGAC	2100
GGTAACATTG	CATTTGCCCT	TAATACGGCA	GATGTTTCTT	TATCTACAGA	CGGAAAAACT	2160
ATCACTGTGG	ATGCTTCAAC	TCCATTCGAA	AATAATACGG	AGTATAAAGT	AGTAGTTAAA	2220
GGTATTAAAG	ACAAAAATGG	CAAAGAATTT	AAAGAAGATG	CATTCACCTT	CAAGCTTCGA	2280
AATGATGCTG	TAGTTACTCA	AGTGTTTGGA	ACTAATGTAA	CAAACAACAC	TTCTGTAAAC	2340
TTAGCAGCAG	GTACTTTCGA	CACTGACGAT	ACTTTAACAG	TAGTATTTGA	TAAGTTGTTA	2400
GCACCTGAAA	CTGTAACAG	CTCGAACGTT	ACTATTACAG	ATGTTGAAAC	TGGAAAACGC	2460
ATTCCAGTAA	TTGCATCTAC	TTCTGGTTCT	ACAATTACTA	TTACGTTAAA	AGAAGCGTTA	2520
GTAACGGTA	AACAATATAA	ACTTGCTATC	AATAATGTTA	AAACATTAAC	TGGTTACAAT	2580
GCAGAAGCTT	ACGAGTTAGT	GTTCACTGCA	AACGCATCAG	CACCAACTGT	TGCTACCGCT	2640
CCTACTACTT	TAGGTGGTAC	AACCTTATCT	ACTGGTTCTC	TTACAACAAA	TGTTTGGGGT	2700
AAATTGGCTG	GTGGTGTGAA	TGAAGCTGGA	ACTTATTATC	CTGGTCTTCA	ATTCAACAACA	2760
ACGTTTGCTA	CTAAGTTAGA	CGAATCTACT	TTAGCTGATA	ACTTTGTATT	AGTTGAAAAA	2820
GAATCTGGTA	CAGTTGTTGC	TTCTGAACTA	AAATATAATG	CAGACGCTAA	AATGGTAACT	2880
TTAGTGCCAA	AAGCGGACCT	TAAAGAAAAT	ACAATCTATC	AAATCAAAAT	TAAAAAAGGC	2940
TTGAAGTCCG	ATAAAGGTAT	TGAATTAGGC	ACTGTTAACG	AGAAAACATA	TGAGTTCAAA	3000
ACTCAAGACT	TAACTGCTCC	TACAGTTATT	AGCGTAACGT	CTAAAAATGG	CGACGCTGGA	3060
TTAAAGTAA	CTGAAGCTCA	AGAATTTACT	GTGAAGTTCT	CAGAGAAITTT	AAATACATTT	3120
AATGCTACAA	CCGTTTCGGG	TAGCACAAATC	ACATACGGTC	AAGTTGCTGT	AGTAAAAGCG	3180

7/13

Fortsetzung Figur 4

GGTGCAAAC	TATCTGCTCT	TACAGCAAGT	GACATCATT	CAGCTAGTGT	TGAAGCGGT	3240
ACTGGTCAAG	ATGGAACATA	CAAAGTCAAA	GTTGCTGCTA	ACCAATTAGA	ACGTAACCAA	3300
GGGTACAAAT	TAGTAGTGTT	CGGTAAAGGT	GCAACAGCTC	CTGTTAAAGA	TGCTGCAAAT	3360
GCAAATACTT	TAGCAACTAA	CTATATCTAT	ACATTTACAA	CTGAAGGTCA	AGACGTAACA	3420
GCACCAACGG	TTACAAAAGT	ATTCAAAGGT	GATTCTTTAA	AAGACGCTGA	TGCAGTTACT	3480
ACACTTACGA	ACGTTGATGC	AGGTCAAAAA	TTCATCTATC	AATTTAGCGA	AGAATTAAAA	3540
ACTTCTAGTG	GTTCTTTAGT	GGGTGGCAA	GTAACGTGCG	AGAAATTAAC	AAACAACGGA	3600
TGGGTAGATG	CTGGTACTGG	AACAACTGTA	TCAGTTGCTC	CTAAGACAGA	TGCAAATGGT	3660
AAAGTAACAG	CTGCTGTGGT	TACATTAAGT	GGTCTTGACA	ATAACGACAA	AGATGCCAAA	3720
TTGCGTCTGG	TAGTAGATAA	GTCTTCTACT	GATGGAATTG	CTGATGTAGC	TGGTAATGTA	3780
ATTAAGGAAA	AAGATATTTT	AATTCGTTAC	AACAGCTGGA	GACACACTGT	AGCTTCTGTG	3840
AAAGCTGCTG	CTGACAAAGA	TGGTCAAAAC	GCTTCTGCTG	CATTCCCAAC	AAGCACTGCA	3900
ATTGATACAA	CTAAGAGCTT	ATTAGTTGAA	TTCAATGAAA	CTGATTTAGC	GGAAGTTAAA	3960
CCTGAGAACA	TCGTTGTAA	AGATGCAGCA	GGTAATGCGG	TAGCTGGTAC	TGTAACAGCA	4020
TTAGACGGTT	CTACAAATAA	ATTTGTATTC	ACTCCATCTC	AAGAATTAAA	AGCTGGTACA	4080
GTTTACTCTG	TAACAATTGA	CGGTGTGAGA	GATAAAGTAG	GTAACACAAT	CTCTAAATAC	4140
ATTACTTCGT	TCAAGACTGT	ATCTGCGAAT	CCAACGTTAT	CTTCAATCAG	CATTGCTGAC	4200
GGTGCAGTTA	ACGTTGACCG	TTCTAAAACA	ATTACAATTG	AATTCAGCGA	TTCAGTTCCA	4260
AACCCAACAA	TCACTCTTAA	GAAGGCTGAC	GGAACCTCAT	TTACTAATTA	CACTTTGTGA	4320
AATGTAAATA	ATGAAAATAA	AACATACAAA	ATTGTATTCC	ACAAAGGTGT	AACACTTGAC	4380
GAGTTTACTC	AATATGAGTT	AGCAGTTTCA	AAAGATTTTC	AAACTGGTAC	TGATATTGAT	4440
AGCAAAGTTA	CATTATCATC	AGGTTCTGTT	GCTACTGACG	AAGTAAAACC	TGCTCTAGTA	4500
GGCGTTGGTT	CATGGAATGG	AACAAGCTAT	ACTCAGGATG	CTGCAGCAAC	ACGACTTCGG	4560
TCTGTAGCTG	ACTTCGTTGC	GGAGCCAGTT	GCCCTTCAAT	TCTCAGAAGG	TATCGATTTA	4620
ACGAATGCAA	CTGTGACAGT	AACAAATATT	ACTGATGATA	AAACTGTTGA	AGTTATTTCA	4680
AAAGAGAGTG	TAGACGCAGA	CCATGATGCA	GGTGCTACTA	AGGAGACATT	AGTAATTAAC	4740
ACAGTTACTC	CTTTAGTACT	TGATAACAGC	AAGACTTATA	AGATTGTTGT	AAGTGGAGTT	4800
AAAGATGCAG	CAGGTAATGT	TGCAGATACT	ATTACATTCT	ATATTAAAGT	ATCTGGGCTA	4860
GGTGTGTTGTC	ACCGCTCAAG	GTTGTCAAAA	TATGTGCGAA	AGCTCTGCGG	AGAGAAATCT	4920
CTGCGGGGCT	TTTCTTTTTC	CTCAAATCTG	TATCAGGATC	CTCTAGAGTC	GACCTGCAGG	4980
CAAGCTTG						4988

8/13

Figur 5

Nukleotidequenz eines SbsA-Gens fusioniert mit der Signalsequenz von Gen3 des Bakteriophagen fd (3768bp)
 Klonierung: SbsA (ohne ss) (SfiI-NotI) in pCANTABSE (SfiI-NotI)
 Merkmale:
 Position 48 bis 60: SfiI-Schnittstelle
 Position 3761 bis 3768: NotI-Schnittstelle
 Position 61 bis 3657: SbsA-Gen ohne eigene Signalsequenz

Signalsequenz		<u>SfiI</u>	
GTGAAAAAAT	TATTATTCGC AATTCCTTTA GTTGTTCCTT TCTATGCGGC CCAGCCGGCC		60
Start SbsA ohne Signalsequenz			
GCTACAGATG	TAGCAACAGT AGTAAGCCAA GCAAAAGCAC AGTTCAAAAA AGCATACTAT		120
ACTTACAGCC	ATACAGTAAC GGAACTGGT GAATTCCTCAA ACATTAAACGA TGTATATGCT		180
GAATACAACA	AAGCGAAAAA ACGATACCGT GATGCGGTAG CATTAGTGAA TAAAGCAGGT		240
GGCGCGAAAA	AAGACGCTTA CTTAGCTGAT TTACAAAAAG AATATGAAAC TTACGTTTTT		300
AAAGCAAACC	CTAAATCTGG CGAAGCTCGT GTAGCAACTT ACATCGATGC TTACAACTAT		360
GCAACAAAAT	TAGACGAAAT GCGCCAAGAG CTAGAGGCTG CTGTTCAAGC AAAAGATTTA		420
GAAAAAGCAG	AACAATACTA TCACAAAATT CCTTATGAAA TTAAACTCG CACAGTCATT		480
TTAGATCGCG	TATATGTAAC AACAACCTCGT GATTTACTTC GCTCTACATT TAAAGCAAAA		540
GCACAAGAAC	TTGCGGACAG CTTAATTTAT GATATTACCG TTGCAATGAA AGCGCGCGAA		600
GTACAAGACG	CTGTGAAAGC AGGCAATTTA GACAAAGCTA AAGCTGCTGT TGATCAAATC		660
AATCAATACT	TACCAAAAGT AACAGATGCT TTCAAACTG AACTAACAGA AGTAGCGAAA		720
AAAGCATTAG	ATGCAGATGA AGCTGCGCTT ACTCCAAAAG TTGAAAGTGT AAGTGCGATT		780
AACACTCAAA	ACAAAGCTGT TGAATTAACA GCAGTACCAG TGAACGGAAC ACTAAAATTA		840
CAACTTTTCA	GCTGTGCAAA TGAAGATACA GTAAACGTAA ATACTGTACG TATCTATAAA		900
GTGGACGGTA	ACATTCCATT TGCCCTTAAT ACGGCAGATG TTTCTTTATC TACAGACGGA		960
AAAACATATCA	CTGTGGATGC TTCAACTCCA TTGAAAATA ATACGGAGTA TAAAGTAGTA		1020
GTAAAGGTA	TTAAAGACAA AAATGGCAAA GAATTTAAAG AAGATGCATT CACTTTCAAG		1080
CTTCGAAATG	ATGCTGTAGT TACTCAAGTG TTTGGAACATA ATGTACAAA CAACACTTCT		1140
GTAAACTTAG	CAGCAGGTAC TTTGACACT GACGATACTT TAACAGTAGT ATTTGATAAG		1200
TTGTTAGCAC	CTGAAACTGT AAACAGCTCG AACGTTACTA TTACAGATGT TGAACTGGA		1260
AAACGCATTG	CAGTAATTGC ATCTACTTCT GGTCTACAA TTACTATTAC GTTAAAGAA		1320
GCGTTAGTAA	CTGGTAAACA ATATAAACTT GCTATCAATA ATGTTAAAC ATTAAGTGGT		1380
TACAATGCAG	AAGCTTACGA GTTAGTGTTT ACTGCAACG CATCAGCACC AACTGTTGCT		1440
ACCGCTCCTA	CTACTTTAGG TGGTACAACCT TTATCTACTG GTTCTCTTAC AACAAATGTT		1500

9/13

Fortsetzung Figur 5

TGGGGTAAAT TGGCTGGTGG TGTGAATGAA GCTGGAACTT ATTATCCTGG TCTTCAATTC	1560
ACAACAACGT TTGCTACTAA GTTAGACGAA TCTACTTTAG CTGATAACTT TGTATTAGTT	1620
GAAAAAGAAT CTGGTACAGT TGTTGCTTCT GAACTAAAAT ATAATGCAGA CGCTAAAATG	1680
GTAACTTTAG TGCCAAAAGC GGACCTTAAA GAAAATACAA TCTATCAAAT CAAAATTAAA	1740
AAAGGCTTGA AGTCCGATAA AGGTATTGAA TTAGGCACTG TTAACGAGAA AACATATGAG	1800
TTCAAACTC AAGACTTAAC TGCTCCTACA GTTATTAGCG TAACGTCTAA AAATGGCGAC	1860
GCTGGATTAA AAGTAACTGA AGCTCAAGAA TTTACTGTGA AGTTCTCAGA GAATTTAAAT	1920
ACATTTAATG CTACAACCGT TTCGGGTAGC ACAATCACAT ACGGTCAAGT TGCTGTAGTA	1980
AAAGCGGGTG CAAACTTATC TGCTCTTACA GCAAGTGACA TCATTCCAGC TAGTGTGAA	2040
GCGGTTACTG GTCAAGATGG AACATACAA GTGAAAGTTG CTGCTAACCA ATTAGAACGT	2100
AACCAAGGGT ACAAATTAGT AGTGTTCGGT AAAGGTGCAA CAGCTCCTGT TAAAGATGCT	2160
GCAATGCAA ATACTTTAGC AACTAACTAT ATCTATACAT TTACAACTGA AGGTCAAGAC	2220
GTAACAGCAC CAACGGTTAC AAAAGTATTC AAAGGTGATT CTTTAAAAGA CGCTGATGCA	2280
GTTACTACAC TTACGAACGT TGATGCAGGT CAAAAATTCA CTATCCAATT TAGCGAAGAA	2340
TTAAAACTT CTAGTGGTTC TTTAGTGGGT GGCAAAGTAA CTGTCGAGAA ATTAACAAAC	2400
AACGGATGGG TAGATGCTGG TACTGGAACA ACTGTATCAG TTGCTCCTAA GACAGATGCA	2460
AATGGTAAAG TAACAGCTGC TGTGGTTACA TTAAGTGGTC TTGACAATAA CGACAAAGAT	2520
GCGAAATTGC GTCTGGTAGT AGATAAGTCT TCTACTGATG GAATTGCTGA TGTAGCTGGT	2580
AATGTAATTA AGGAAAAAGA TATTTTAATT CGTTACAACA GCTGGAGACA CACTGTAGCT	2640
TCTGTGAAAG CTGCTGCTGA CAAAGATGGT CAAAACGCTT CTGCTGCATT CCCAACAAGC	2700
ACTGCAATTG ATACAATAA GAGCTTATTA GTTGAATTCA ATGAACTGA TTTAGCGGAA	2760
GTTAAACCTG AGAACATCGT TGTTAAAGAT GCAGCAGGTA ATGCGGTAGC TGGTACTGTA	2820
ACAGCATTAG ACGGTTCTAC AAATAAATTT GTATTCACTC CATCTCAAGA ATTAAAAGCT	2880
GGTACAGTTT ACTCTGTAAC AATTGACGGT GTGAGAGATA AAGTAGGTAA CACAATCTCT	2940
AAATACATTA CTTCGTTCAA GACTGTATCT GCGAATCCAA CGTTATCTTC AATCAGCATT	3000
GCTGACGGTG CAGTTAACGT TGACCGTTCT AAAACAATTA CAATTGAATT CAGCGATTCA	3060
GTTCCAAACC CAACAATCAC TCTTAAGAAG GCTGACGGAA CTTCAATTTAC TAATTACACT	3120
TTAGTAAATG TAAATAATGA AAATAAAACA TACAAAATTG TATTCCACAA AGGTGTAACA	3180
CTTGACGAGT TTAATCAATA TGAGTTAGCA GTTTCAAAG ATTTTCAAAC TGGTACTGAT	3240
ATTGATAGCA AAGTTACATT CATCACAGGT TCTGTTGCTA CTGACGAAGT AAAACCTGCT	3300

10/13

Fortsetzung Figur 5

CTAGTAGGCG TTGGTTCATG GAATGGAACA AGCTATACTC AGGATGCTGC AGCAACACGA	3360
CTTCGGTCTG TAGCTGACTT CGTTGCGGAG CCAGTTGCCC TTCAATTCTC AGAAGGTATC	3420
GATTTAACGA ATGCAACTGT GACAGTAACA AATATTACTG ATGATAAAAC TGTTGAAGTT	3480
ATTTCAAAG AGAGTGTAGA CGCAGACCAT GATGCAGGTG CTTACTAAGGA GACATTAGTA	3540
ATTAACACAG TTACTCCTTT AGTACTTGAT AACAGCAAGA CTTATAAGAT TGTTGTAAGT	3600
GGAGTTAAAG ATGCAGCAGG TAATGTTGCA GATACTATTA CATTCTATAT TAAGTAATCT	3660
GGGCTAGGTG TTTGTCACCG CTCAAGGTTG TCAAAATATG TCGAAAAGCT CTGCGGAGAG	3720
AAATCTCTGC GGGGCTTTTC TTTTGTCTCA AATCTGTATC <u>NotI</u> <u>GCGGCCGC</u>	3768

11/13

Figur 6

Nukleotidsequenz eines SbsB-Gens fusioniert mit dem MalE-Gen einschließlich dessen Signalsequenz (4065bp)
Klonierung: MalE aus pMal-p2 mit SbsB (ohne ss) in BamHI von MCS

Merkmale:

Position 1249 bis 1254: BamHI-Schnittstelle
Position 4033 bis 4038: BamHI-Schnittstelle
Position 1255 bis 3924: SbsB-Gen ohne eigene Signalsequenz

Start MalE-Gen mit Signalsequenz

ATGAAATAA AAACAGGTGC ACGCATCCTC GCATTATCCG CATTACGAC GATGATGTTT	60
TCCGCCTCGG CTCTCGCCAA AATCGAAGAA GGTAAGTGG TAATCTGGAT TAACGGCGAT	120
AAAGGCTATA ACGGTCTCGC TGAAGTCGGT AAGAAATTCC AGAAAGATAC CGGAATTAAA	180
GTCACCGTTG AGCATCCGGA TAACTGGAA GAGAAATTCC CACAGGTTGC GGCAACTGGC	240
GATGGCCCTG ACATTATCTT CTGGGCACAC GACCGCTTTG GTGGCTACGC TCAATCTGGC	300
CTGTTGGCTG AAATCACCCC GGACAAAGCG TTCCAGGACA AGCTGTATCC GTTTACCTGG	360
GATGCCGTAC GTTACAACGG CAAGCTGATT GCTTACCCGA TCGCTGTTGA AGCGTTATCG	420
CTGATTTATA ACAAAGATCT GCTGCCGAAC CCGCCAAAAA CCTGGGAAGA GATCCCGGCG	480
CTGGATAAAG AACTGAAAGC GAAAGGTAAG AGCGCGCTGA TGTTCACCT GCAAGAACCG	540
TACTTCACCT GGCCGCTGAT TGCTGCTGAC GGGGGTTATG CGTTCAGTA TGAAAACGGC	600
AAGTACGACA TTAAAGACGT GGGCGTGGAT AACGCTGGCG CGAAAGCGGG TCTGACCTTC	660
CTGGTTGACC TGATTAAAA CAAACACATG AATGCAGACA CCGATTACTC CATCGCAGAA	720
GCTGCCTTTA ATAAAGGCGA AACAGCGATG ACCATCAACG GCCCCTGGGC ATGGTCCAAC	780
ATCGACACCA GCAATTGAA TTATGGTGTA ACGGTACTGC CGACCTTCAA GGGTCACCCA	840
TCCAAACCGT TCGTTGGCGT GCTGAGCGCA GGTATTAACG CCGCCAGTCC GAACAAAGAG	900
TTGGCGAAAG AGTTCCTCGA AACTATCTG CTGACTGATG AAGGTCTGGA AGCGGTTAAT	960
AAAGACAAAC CGCTGGGTGC CGTAGCGCTG AAGTCTTACG AGGAAGAGTT GGCAGAAAGAT	1020
CCACGTATTG CCGCCACCAT GGAAAACGCC CAGAAAGGTG AAATCATGCC GAACATCCCG	1080
CAGATGTCCG CTTTCTGGTA TGCCGTGCGT ACTGCGGTGA TCAACGCCGC CAGCGGTCTG	1140
CAGATCGTCG ATGAAGCCCT GAAAGACGCG CAGACTAATT CGAGCTCGAA CAACAACAAC	1200
AATAACAATA ACAACAACCT CGGGATCGAG GGAAGGATT CAGAATTCGG <u>ATCGCAAGC</u>	1260
TTCACAGATG TTGCGCCGCA ATATAAGAT GCGATCGATT TCTTAGTATC AACTGGTGCA	1320
ACAAAAGGTA AAACAGAAAC AAAATTCGGC GTTTACGATG AAATCACTCG TCTAGATGCG	1380
GCAGTTATTC TTGCAAGAGT ATTAAACTA GACGTTGACA ACGCAAAGA CGCAGGCTTC	1440
ACAGATGTGC CAAAAGACCG TGCAAATAC GTCAACGCGC TTGTAGAAGC TGGCGTATTA	1500

12/13

Fortsetzung Figur 6

AACGGTAAAG CACCTGGCAA ATTTGGTGCA TACGACCCAT TAACTCGCGT TGAAAE+äTGGCA	1560
AAAATCATCG CGAACCGTTA CAAATTAAAA GCTGACGATG TAAAACTTCC ATTCACTGAT	1620
GTAAACGATA CATGGGCACC ATACGTAAAA GCGCTTTATA AATACGAAGT AACAAAAGGT	1680
AAAACACCAA CAAGCTTCGG TGCATACCAA AACATCACTC GCGGTGACTT TGCGCAATTT	1740
GTATATAGAG CGGTGAATAT TAATGCAGTG CCAGAAATAG TTGAAGTAAC TCGGGTTAAT	1800
TCGACTACAG TGAAAGTAAC ATTCAATACG CAAATTGCTG ATGTTGATTT CACAAATTTT	1860
GCTATCGATA ACGGTTTAAAC TGTACTATAA GCAACTCTTT CTöGTGATAA AAAATCCGTA	1920
GAGGTTGTGG TAAATAAACC GTTACTCGT AATCAGGAAT ATACAATTAC AGCGACAGGC	1980
ATTAAAAATT TAAAAGGCGA GACCGCTAAG GAATTAAGTG GTAAGTTTGT TTGGTCTGTT	2040
CAAGATGCGG TAACTGTTGC ACTAAATAAT AGTTCGCTTA AAGTTGGAGA GGAATCTGGT	2100
TTAACTGTAA AAGATCAGGA TGGCAAAGAT GTTGTAGGTG CTAAAGTAGA ACTTACTTCT	2160
TCTAATACTA ATATTGTTGT AGTTTCAAGT GCGGAAGTAT CAGTATCTGC TGCTAAAGTT	2220
ACAGCTGTAA AACCGGGAAC AGCTGATGTT ACTGCAAAAG TTACATTACC AGATGGTGTT	2280
GTAATAACAA ATACATTTAA AGTGACAGTT ACAGAAGTGC CTGTGCAAGT ACAAATCAA	2340
GGATTTACTT TAGTTGATAA TCTTTCTAAT GCTCCACAGA ATACAGTTGC ATTTAACAAA	2400
GCTGAGAAAG TAACTTCAAT GTTGTGTTGA GAACTAAAA CAGTTGCAAT GTATGATACT	2460
AAAAACGGTG ATCCTGAAAC TAAACCTGTT GATTTCAAAG ATGCAACTGT ACGTTCATTA	2520
AATCCAATTA TTGCAACAGC TGCTATTAAT GGTAGTGAGC TCCTTGTCAC AGCTAATGCT	2580
GGCCAATCTG GAAAAGCTTC ATTTGAAGTA ACATTTAAAG ATAATACAAA AAGAACATTT	2640
ACAGTTGATG TGAAAAAAGA CCCTGTATTA CAAGATATTA AAGTAGATGC AACTTCTGTT	2700
AAACTTCCG ATGAAGCTGT TGGCGGCGGG GAAGTTGAAG GAGTTAACCA AAAAACGATT	2760
AAAGTAAGTG CAGTTGACCA ATACGGTAAA GAAATTAAAT TTGGTACAAA AGGTAAAGTT	2820
ACTGTTACAA CTAATACAGA AGGACTAGTT ATTAATAATG TAAATAGCGA TAATACAATT	2880
GACTTTGATA GCGGCAATAG TGCAACTGAC CAATTTGTTG TCGTTGCAAC AAAAGACAAA	2940
ATTGTCAATG GTAAAGTAGA AGTTAAATAT TTCAAAAATG CTAGTGACAC AACACCAACT	3000
TCAACTAAAA CAATTACTGT TAATGTAGTG AATGTAAAAG CTGACGCTAC ACCAGTAGGA	3060
TIAGATATTG TAGCACCTTC TGAAATTGAT GTGAATGCTC CAAACACTGC TTCTACTGCA	3120
GATGTTGATT TTATTAATTT CGAAAGTGTT GAGATTTATA CACTCGATTC TAATGGTAAC	3180
CGTCTTAAAA AAGTTACTCC AACTGCAACT ACACTTGTAG GTACTAATGA TTATGTTGAA	3240
GTTAATGGGA ATGTATTACA ATTCAAGGGT AACGATGAAT TAACGCTATT AACTTCTTCT	3300

13/13

Fortsetzung Figur 6

AGTACAGTAA	ACGTTGATGT	AACAGCTGAT	GGAATTACAA	AACGTATTCC	AGTAAAATAT	3360
ATCAACTCTG	CAAGTGTACC	TGCCAGTGCA	ACAGTAGCAA	CAAGTCCTGT	TACTGTTAAG	3420
CTTAATTCAA	GTGATAATGA	TTTAACATTT	GAAGAATTAA	TATTCGGTGT	AATTGACCTT	3480
ACACAATTAG	TCAAAGATGA	AGACATCAAC	GAATTTATTG	CAGTTTCAAA	AGCGGCTAAA	3540
AATGATGGAT	ATTTCTATAA	TAAACCGCTT	GTAACGGTTA	AAGATGCATC	AGGAAAAGTT	3600
ATTCCAACAG	GTGCAAATGT	TTACGGTCTA	AATCATGATG	CAACTAACGG	AAACATTTGG	3660
TTTGATGAGG	AACAAGCTGG	CTTAGCTAAA	AAATTTAGTG	ATGTACATTT	TGATGTTGAT	3720
TTTTCAATTAG	CTAACGTTGT	AAAAACTGGT	AGCGGTACAG	TTTCTTCATC	GCCATCATT	3780
TCTGACGCAA	TTCAACTTAC	TAATTCAGGC	GATGCAGTAT	CGTTTACATT	AGTTATCAAA	3840
TCAATTTATG	TTAAAGGCGC	AGATAAAGAT	GATAATAACT	TACTTGCAGC	CCCTGTTTCT	3900
	Stop SbsB					
GTCAATGTGA	CTGTGACAAA	ATAATTTTGA	GGTTCGGTCT	CTGTTACCAT	TTGAAAAATG	3960
CCGAAAAGCT	CTGCGGAGAG	AAATCTCTGC	GGGGCTTTTC	TTTTTGGTTC	TATGTCAATT	4020
	BamHI					
GTTGAGGTGC	ATGGATCCTC	TAGAGTCGAC	CTGCAGGCAA	GCTTG		4065

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 98/04723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/31 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KUEN B ET AL: "HETEROLOGOUS EXPRESSION AND SELF-ASSEMBLY OF THE S-LAYER PROTEIN SBSA OF BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS IN ESCHERICHIA COLI" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 19, no. 3, February 1996, pages 495-503, XP000675407 see page 500, left-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1, 3, 5, 28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 1998

Date of mailing of the international search report

17/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/EP 98/04723

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KUEN B ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS PV72 S-LAYER GENE SBSB INDUCED BY OXIDATIVE STRESS"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 179, no. 5, March 1997, pages 1664-1670, XP000674432 see page 167, right-hand column, paragraph 2; figure 3C</p>	1,3,6,28
Y	<p>-----</p> <p>CLEMENT J -M ET AL: "Secretion of a bacterial protein by mammalian cells"</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 43, no. 3, 15 December 1995, page 169-181 XP004036873 cited in the application see the whole document</p>	1,3,5,6, 28
A	<p>-----</p> <p>PEYRET J L ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE CSPB GENE ENCODING PS2, AN ORDERED SURFACE-LAYER PROTEIN IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 9, no. 1, 1993, pages 97-109, XP000674434 cited in the application see the whole document</p>	1,3
A	<p>-----</p> <p>WO 95 19371 A (DESOMER JAN ;DEBLAERE ROLF Y (BE); DHAESE PATRICK (BE); SOLVAY (BE) 20 July 1995 see page 9, line 17 - line 35</p> <p>-----</p>	1,10

Information on patent family members

PCT/EP 98/04723

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. tionaler Aktenzeichen

PCT/EP 98/04723

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/31 C12N15/62

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KUEN B ET AL: "HETEROLOGOUS EXPRESSION AND SELF-ASSEMBLY OF THE S-LAYER PROTEIN SBSA OF BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS IN ESCHERICHIA COLI" MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 19, Nr. 3, Februar 1996, Seiten 495-503, XP000675407 siehe Seite 500, linke Spalte, Absatz 2	1, 3, 5, 2B
Y	KUEN B ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS PV72 S-LAYER GENE SBSB INDUCED BY OXIDATIVE STRESS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 179, Nr. 5, März 1997, Seiten 1664-1670, XP000674432 siehe Seite 167, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 3C	I, 3, 6, 2B

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Dezember 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/12/1998

Name und Postenschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patenten 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04723

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CLEMENT J -M ET AL: "Secretion of a bacterial protein by mammalian cells" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 43, Nr. 3, 15. Dezember 1995, Seite 169-181 XP004036873 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,3,5,6, 28
A	PEYRET J L ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE CSPB GENE ENCODING PS2, AN OUTER SURFACE-LAYER PROTEIN IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM" MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 9, Nr. 1, 1993, Seiten 97-109, XP000674434 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,3
A	WO 95 19371 A (DESOMER JAN ;OEBLAERE ROLF Y (BE); OHAESE PATRICK (BE); SOLVAY (BE) 20. Juli 1995 siehe Seite 9, Zeile 17 - Zeile 35 -----	1,10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04723

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9519371 A	20-07-1995	EP 0738278 A	23-10-1996
		JP 9508012 T	19-08-1997
<hr/>			